

Charakterisierung Epstein-Barr Virus-infizierter B-Zellen

der infektiösen Mononukleose:

Virale Strategien zur Ausbreitung im B-Zellkompartiment

und zur Etablierung einer lebenslangen Persistenz

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Julia Bernadette Kurth

aus Porz am Rhein

Köln, 2002

Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Rajewsky
Prof. Dr. Börries Kemper

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 2003

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AID	Aktivierungs-induzierte Cytidine Deaminase (activation-induced cytidine deaminase)
bp	Basenpaar
BL	Burkitt-Lymphom
C	konstante Region der Antikörper
CDR	Komplementaritätsregion der Antikörper (complementarity determining region)
D	Diversitäts- (diversity) Gensegment der Immunoglobulin-Schwerkette
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBER	EBV-kodierte kleine RNA (EBV-encoded small RNA)
EBNA	EBV-kodiertes nukleäres Antigen (EBV nuclear antigen)
EBV	Epstein-Barr Virus
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	Gerüstregion der Antikörper (frame work region)
GC	Keimzentrum
H	Immunoglobulin-Schwerkette
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg
IFR	interfollikuläre Region
Ig	Immunoglobulin
IM	infektiöse Mononukleose
J	Verbindungs- (joining) Gensegment der Immunoglobulin-Ketten
□	Immunoglobulin □
L	Immunoglobulin-Leichtkette
□	Immunoglobulin □
LMP	latentes Membranprotein (latent membrane protein)
MH	Morbus Hodgkin
MHC	Haupthistocompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	primer extension preamplification
PTLD	Posttransplantationslymphom
R	Aminosäureaustauschmutation (replacement mutation)
S	stille Mutation (silent mutation)
V	variables Gensegment der Immunoglobulin-Ketten variable Region der Antikörper

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

1.1	Die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark.....	2
1.2	Die Keimzentrumsreaktion.....	5
1.3	Das Epstein-Barr Virus	12
1.4	Die Wirkung einiger EBV-kodierter, latenter Genprodukte	13
1.5	Die primäre EBV-Infektion und die Persistenz des Virus.....	16
1.6	EBV-assoziierte Krankheiten	20
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	23

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1	Untersuchtes Gewebe und klinische Daten der Patienten.....	24
2.2	EBER in-situ Hybridisierung.....	25
2.3	Immunfärbungen	26
2.3.1	Das ABC-System	27
2.3.2	Fluoreszenzfärbungen.....	28
2.4	Isolierung EBV-infizierten Zellen mittels hydraulischer Mikromanipulation.....	29
2.5	Einzelzell-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.5.1	Präamplifikation des gesamten Genoms einer Zelle (PEP)	29
2.5.2	V-Gen-PCR.....	30
2.5.3	EBV-PCR.....	34
2.5.4	Durchgeführte PCR-Analysen	36
2.6	Sequenzanalyse	37

3 ERGEBNISSE

3.1	Untersuchung EBV-infizierter Zellen während der IM.....	39
3.1.1	Lokalisation EBV-infizierter Zellen in Tonsillen von IM-Patienten.....	39
3.1.2	Immunhistochemische und morphologische Analyse EBV-infizierter Zellen.....	39
3.1.3	PCR-Analyse einzelner mikromanipulierter EBV-infizierter Zellen	43
3.1.3.1	Schlußfolgerungen, die aufgrund von V-Gen-Analysen gezogen werden können	43
3.1.3.2	Untersuchte Subpopulationen EBV-infizierter Zellen	44
3.1.3.3	PCR-Analyse.....	45
3.1.4	Naive, Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen sind EBV-infiziert	48
3.1.5	Klonale Expansion EBV-infizierter Zellen.....	51
3.1.6	Phänotypische Variation innerhalb EBV-infizierter Klone.....	54
3.2	Untersuchung EBV-infizierter Zellen des Keimzentrums.....	56
3.2.1	Histologische Verteilung EBV-infizierter Zellen während der IM	56
3.2.2	Immunhistochemische Analyse EBV-infizierter Zellen.....	58
3.2.3	PCR-Analyse einzelner mikromanipulierter EBV-infizierter Zellen	58
3.2.4	EBV-negative B-Zellen in Keimzentren nehmen an der Keimzentrumsreaktion teil.....	62
3.2.5	EBV-infizierte B-Zellen in Keimzentren nehmen nicht an der Keimzentrumsreaktion teil	64
3.3	Vergleich von EBV-infizierten Zellen mit Tumorzellen EBV-assoziiierter B-Zell-Lymphome	65
3.3.1	Vergleich von HRS-ähnlichen Zellen der IM mit HRS-Zellen des MH	65
3.3.2	Vergleich EBV-infizierter B-Zellen in Keimzentren der IM mit EBV-assoziierten Lymphomen, die vom Keimzentrums-B-Zellen abstammen.....	67

4	DISKUSSION	
4.1	Lokalisation und Latenzformen EBV-infizierter Zellen der IM	71
4.2	EBV-infizierte B-Zellen der IFR	73
4.2.1	Sowohl naive als auch Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen sind EBV-infiziert.....	73
4.2.2	Naive, Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen werden direkt infiziert	75
4.2.3	Die Population EBV-infizierter Zellen wird im starken Maße durch Proliferation infizierter Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen gebildet	76
4.3	EBV-infizierte Zellen der Keimzentren.....	79
4.3.1	EBV-infizierte Zellen im Keimzentrum nehmen nicht an der Keimzentrumsreaktion teil	79
4.3.2	Mögliche Beeinflussung EBV-infizierter Zellen durch die Expression EBV-kodierter Gene	80
4.4	Modell zur Ausbreitung von EBV im B-Zellkompartiment und der Differenzierung infizierter B-Zellen während der IM.....	83
4.4.1	Vergleich der Modelle zur Ausbreitung des Virus im B-Zellkompartiment während IM und Persistenz	85
4.5	Vergleich EBV-infizierter Zellen mit Tumorzellen EBV-assoziiierter B-Zell-Lymphome	87
4.6	Ausblick.....	89
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
6	ABSTRACT.....	93
7	LITERATUR.....	95
8	DANKSAGUNG	107

1 EINLEITUNG

Das Immunsystem der Wirbeltiere schützt den Körper vor eingedrungenen Fremdstoffen wie Bakterien, Viren und Pilzen. Die frühe Phase der Immunreaktion beruht auf der unspezifischen Immunantwort, durch die Pathogene zum Beispiel durch phagozytierende Zellen eliminiert werden. Dabei werden häufige, konservierte Bestandteile der Pathogene (zum Beispiel bakterielles Lipopolysaccharid oder bakterielle DNA) durch Rezeptoren der phagozytierenden Zellen gebunden und die Phagozytose ausgelöst. Im Gegensatz zu dieser unspezifischen Immunantwort kann während der spezifischen Immunantwort ein verstärkter Schutz vor wiederholter Infektion und vor neuartigen Pathogenen entwickelt werden. An dieser spezifischen Immunantwort sind vor allen Dingen zwei Zelltypen beteiligt - B-Zellen und T-Zellen. B-Zellen können sowohl zellulär gebundene als auch lösliche Antigene direkt mit Hilfe der von ihnen gebildeten Antikörper binden. T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors Antigene in Form prozessierter Peptide, die ihnen von Antigen-präsentierenden Zellen auf dem MHC-Komplex (MHC, major histocompatibility complex) präsentiert werden. Die Antwort auf diese Antigenbindung unterscheidet sich je nach Art der aktivierten T-Zellen. Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen, welche infizierte Zellen direkt eliminieren, bekämpfen T-Helferzellen die Pathogene indirekt, indem sie die Immunantwort über Ausschüttung von Botenstoffen oder über Zellinteraktionen stimulieren.

Die Immunreaktionen können zudem abhängig von den beteiligten Zelltypen untergliedert werden: B-Zell-vermittelte, T-Zell-unabhängige Immunantworten werden direkt durch polymere Antigene mit sich wiederholenden Antikörper-Bindungsstellen induziert. Während T-Zell-abhängiger Immunreaktionen kommt es hingegen zur Interaktion von B- und T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen. Im Verlauf dieser Reaktion werden neben Antikörper-sezernierenden Plasmazellen langlebige Gedächtniszellen gebildet, die auf der Zelloberfläche hochaffine Antikörper tragen.

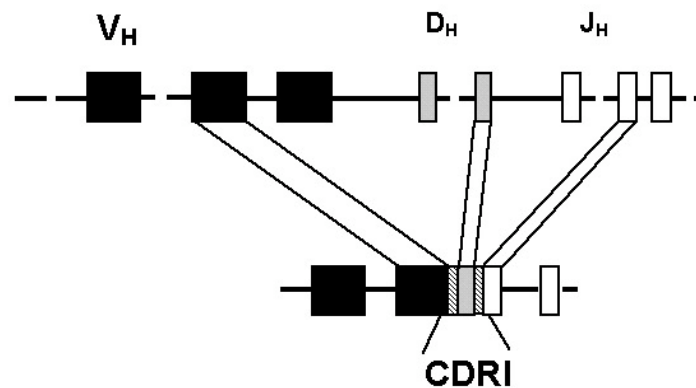
1.1 Die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark

Die B-Zellen des Menschen werden in einer Reihe von Differenzierungsprozessen gebildet. Durch diese regulierten Entwicklungsprozesse, die im Fötus überwiegend in der Leber und nach der Geburt im Knochenmark stattfinden, wird sowohl die große Diversität der Antikörper als auch die Selektion der B-Zellen mit funktionellen, nicht autoreaktiven Antikörpern gewährleistet (Rajewsky, 1996).

Antikörper setzen sich aus je zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten zusammen. Bei den Leichtketten werden zwei Typen, kappa (κ) und lambda (λ) leichte Kette, unterschieden. Sowohl die schwere als auch die leichte Ketten verfügen über eine carboxyterminale konstante (constant, C) und eine aminoternale variable (V-) Region. Diese V-Region, welche die Antigenbindung der Antikörper vermittelt, wird in vier Gerüstregionen (framework region, FR) und drei hypervariable Regionen (complementary determining region, CDR) untergliedert. Die FR sind für die Struktur der Antikörper-V-Regionen wichtig und zeigen daher relativ geringe Diversität, während sich die CDRs, die eigentlichen Regionen der Antigenbindung, durch eine große Vielfalt auszeichnen.

Zu Beginn der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark werden die V-Regionen der schweren Ketten durch somatische Rekombination von drei voneinander getrennten Gensegmenten, den Variablen- (V), den Diversitäts- (D) und den Verbindungs- (joining, J) Gensegmenten, gebildet (Abbildung 1; Rajewsky, 1996). Dieser Prozeß wird durch zwei Proteine, RAG1 und RAG2 (recombination-activating genes 1 und 2), vermittelt (McBlane et al., 1995; Oettinger et al., 1990). Während der Rekombination kann eine Exonuklease einzelne Nukleotide an den Enden der umgelagerten V-, D- und J-Gensegmente abbauen. Zudem kann das Enzym terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) zusätzliche, nicht keimbahnkodierte Nukleotide an die Enden der einzelnen Gensegmente anfügen, die als N-Nukleotide bezeichnet werden (Tonegawa, 1983). Gelegentlich werden auch sogenannte P-Nukleotide zwischen den umgelagerten Gensegmenten eingeführt. Diese entstehen, wenn die bei der V(D)J-Rekombination an

den Enden der Gensegmente gebildeten Haarnadelstrukturen versetzt aufgeschnitten wurde und der entstandene DNA-Einzelstrang (bestehend aus dem kodierenden DNA-Strang sowie einigen Nukleotiden des Gegenstrangs) zum Doppelstrang ergänzt wird (Laffaille et al., 1989). Da durch diese zusätzlich eingeführten Nukleotide die einzelnen Gensegmente ungenau verbunden werden, kann es zu einer Verschiebung des Leserasters der Gene der V-Region kommen. Falls eine solche nicht produktive Umlagerung ("out-of-frame" Umlagerung) erfolgt, wird die Rekombination auf dem zweiten Locus der schweren Kette eingeleitet (Rajewsky, 1996). Nach produktiver Rekombination eines Schwerkettenlocus wird diese funktionell rekombinierte Schwerkette in Kombination mit der sogenannten "surrogate" Leichtkette als "prä-B-Zellrezeptor" auf der Oberfläche ausgeprägt (Meffre et al., 2000; Rajewsky, 1996). In der Mehrzahl der B-Zellen erfolgen die Genumlagerungen der Leichtkettenloci erst nach der Ausprägung der funktionell umgelagerten Schwerkette; in einigen B-Zellen werden die Leichtkettenloci allerdings vor den Schwerkettenloci rearrangiert (Novobrantseva et al., 1999). Die Rekombination der V- und J-Gensegmente der Leichtkettenloci erfolgt mit Hilfe der gleichen Enzyme wie beim Schwerkettenlocus (RAG1, RAG2, Exonuklease, TdT). In den meisten, wenn auch nicht allen B-Zellen findet zunächst die Umlagerung im κ -Leichtkettenlocus statt (Bräuninger et al., 2001a; Rajewsky, 1996). Werden auf beiden Chromosomen nicht-funktionelle κ -Umlagerungen gebildet, so erfolgt anschließend die Umlagerung des λ -Leichtkettenlocus. Nur Zellen, die einen funktionellen, nicht autoreaktiven Antikörper bilden, verlassen als antigenunerfahrene ("naive") B-Zellen das Knochenmark und gelangen in die Peripherie (Rajewsky, 1996). In B-Zellen mit autoreaktiven Antikörpern können sekundäre Rekombinationsprozesse (Receptor Editing) eingeleitet werden und auf diese Weise funktionelle, nicht autoreaktive Antikörper gebildet werden (Casellas et al., 2001; Pelanda et al., 1997; Retter and Nemazee, 1998; Tiegs et al., 1993). Gelingt dies nicht stirbt die Zelle im Knochenmark. Alternativ kann auch Anergie (Unempfindlichkeit für das Antigen) eingeleitet werden (Goodnow et al., 1988).

Abbildung 1. V (D) J Rekombination des Schwerkettenlocus

Schematische Darstellung der V(D)J-Rekombination des Schwerekettenlocus. Aus einer Vielzahl von V-, D- und J-Gensegmenten werden einzelne Segmente zur V-Region des Antikörpers zusammengesetzt. Zwischen den umgelagerten Gensegmenten können nicht keimbahnkodierte N-Nukleotide eingefügt werden (schraffierte Bereiche).

Die große Diversität der Antikörper wird durch die somatische Rekombination der V-, (D-) und J-Gensegmente, den Abbau und das Einfügen von Nukleotiden an den Enden der Gensegmente und die Kombination verschiedener leichter und schwerer Ketten ermöglicht (Tonegawa, 1983). Weiterhin spielt die große Anzahl verschiedener V-, D- und J-Gensegmente, die während der somatischen Rekombination frei kombiniert werden, eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Antikörpervielfalt: Im Schwerekettenlocus des Menschen stehen etwa 50 funktionelle V_H-Gene (Cook et al., 1994; Matsuda et al., 1993), 27 D_H-Gene (Corbett et al., 1997) und 6 J_H-Gene (Ravetch et al., 1981) zur Verfügung. Der κ -Locus beinhaltet 38 funktionelle V _{κ} -Gene (Tomlinson and Cook, 1997) sowie 5 J _{κ} -Gene (Hieter et al., 1982), der λ -Locus setzt sich aus etwa 30 funktionellen V _{λ} -Genen (Williams et al., 1996) sowie 4 funktionellen J _{λ} -Genen (Vasicek and Leder, 1990) zusammen. Da auf diese Weise bis zu 10^{13} verschiedene Antikörper erzeugt werden können (Davis et al., 1998), ist es unwahrscheinlich, daß zwei unabhängige, nicht klonal verwandte B-Zellen die gleichen Umlagerungen bilden und somit identische Antikörper ausprägen. Besonders die Sequenz der CDRIII-Regionen der schweren und der leichten Ketten, die aus Teilen der V- und J-Gensegmente, nicht keimbahnkodierten Nukleotiden sowie bei der schweren Kette

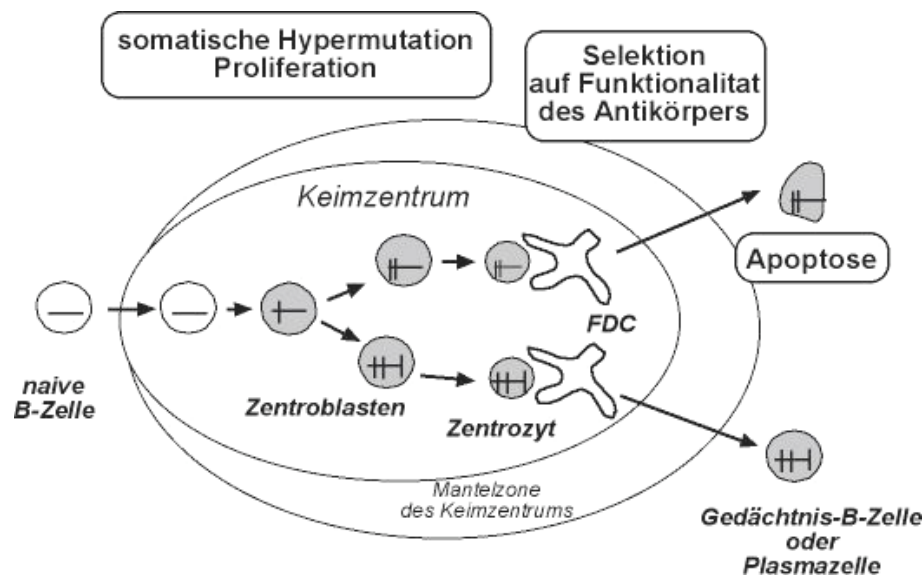
dem D-Gensegment gebildet werden (Abbildung 1), sind für eine B-Zelle und deren Tochterzellen spezifisch und dienen als klonale Marker.

1.2 Die Keimzentrumsreaktion

Im Verlauf T-Zell-abhängiger Immunantworten findet im Keimzentrum eine weitere Diversifizierung der Antikörper durch somatische Hypermutation statt. Während dieses Prozesses werden Mutationen in umgelagerte Antikörpergene der B-Zellen eingeführt. Anschließend erfolgt die Selektion der B-Zellen über die veränderten Antikörper (Rajewsky, 1996).

Keimzentren entstehen im Verlauf einer T-Zell-abhängigen Immunantwort, nachdem antigenspezifische, naive B-Zellen in der T-Zellzone der peripheren lymphoiden Organe, wie Lymphknoten und Tonsillen, aktiviert werden (Jacobs and Kelsoe, 1992). Infolge dieser Aktivierung proliferieren antigenspezifische naive B-Zellen und bilden sogenannte B-Zell-Foci aus. Einige der aktivierten B-Zellen entwickeln sich zu Plasmazellen, welche Antikörper niedriger Affinität produzieren (Liu et al., 1991). Andere aktivierte B-Zellen wandern in primäre Follikel ein, die sich aus ruhenden B-Zellen und einem Netzwerk von follikuläre dendritischen Zellen (follicular dendritic cell, FDC) zusammensetzen (Jacobs and Kelsoe, 1992). Im Anschluß daran entsteht die histologische Struktur des Keimzentrums, indem die eingewanderten, antigenspezifischen B-Zellen proliferieren und dadurch die ruhenden B-Zellen der primären Follikel aus dem FDC-Netzwerk drängen (Liu et al., 1992). Auf diese Weise wird vermutlich die Mantelzone aus kleinen, ruhenden B-Zellen gebildet, welche das Keimzentrum umgibt. Im Verlauf der Keimzentrumsreaktion entwickeln sich in den Keimzentren zwei im histologischen Bild definierte Bereiche (Kroese et al., 1990; Liu et al., 1992): Die dunkle Zone der Keimzentren besteht hauptsächlich aus stark proliferierenden B-Zellen, den sogenannten Zentroblasten. In der hellen Zone der Keimzentren befinden sich neben T-Helferzellen, Makrophagen und FDCs vor allen Dingen nicht proliferierende B-Zellen, die Zentrozyten (Kroese et al., 1990; Stein et al.,

1982). Es wird angenommen, daß der Prozeß der somatischen Hypermutation in den Zentroblasten stattfindet (Liu et al., 1992). Dabei werden Mutationen in die Gene der Antikörper-V-Regionen der proliferierenden B-Zellen eingeführt (Abbildung 2; Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991; Kocks and Rajewsky, 1989). Anschließend wechseln die Zentroblasten in die helle Zone und entwickeln sich dort zu Zentrozyten (Abbildung 2). Diese prägen die durch somatische Mutationen veränderten Antikörper auf der Zelloberfläche aus und nehmen auf diese Weise Kontakt zu Antigen-Antikörper-Komplexen auf, die an der Zelloberfläche der FDCs gebunden sind (Kroese et al., 1990). Da nur eine limitierte Menge des spezifischen Antigens von den FDCs präsentiert wird, konkurrieren die Zentrozyten um dieses Antigen. B-Zellen, die als Folge der Mutationen keinen Antikörper mehr bilden können, und B-Zellen mit geringer Affinität zu dem gegebenen Antigen oder mit Affinität zu Autoantigenen werden durch Apoptose entfernt (Abbildung 2; Kelsoe, 1996; Rajewsky, 1996). Nur Zellen mit verbesserter Bindungsqualität des Antikörpers können das FDC-assoziierte Antigen binden und werden sowohl durch die Interaktion mit FDCs als auch mit antigenspezifischen T-Helferzellen positiv selektioniert (Abbildung 2; Rajewsky, 1996). Anschließend durchlaufen diese B-Zellen entweder eine erneute Runde der Mutation und Selektion oder sie verlassen die Keimzentren und differenzieren zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen (MacLennan et al., 1992).

Abbildung 2. Die Keimzentrumsreaktion


Schematische Darstellung der Keimzentrumsreaktion. Horizontale Linien stellen V-Genumlagerungen dar und vertikale Linien somatische Mutationen. Im Keimzentrum werden somatische Mutationen in V-Genumlagerungen proliferierender B-Zellen eingeführt, so daß B-Zellklone entstehen, deren Mitglieder sich in einzelnen Mutationen unterscheiden. Naive B-Zellen und Keimzentrums-Gründer-B-Zellen sind durch unmutierte V-Genumlagerungen charakterisiert (weiß dargestellte Zellen), Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen sind durch mutierte V-Genumlagerungen gekennzeichnet (grau dargestellte Zellen). Die Selektion der B-Zellen erfolgt durch Interaktion mit follikulären dendritischen Zellen (FDCs) und T-Zellen (nicht dargestellt).

Schon lange wurde vermutet, daß die Affinitätsreifung in den Strukturen der Keimzentren stattfindet. Durch Mikromanipulation von Keimzentrums-B-Zellen aus der Milz der Maus und einzelner Keimzentrums-B-Zellen aus menschlichen Lymphknoten sowie Isolierung von Keimzentrums-B-Zellen der Maus aufgrund der Expression Keimzentrums-spezifischer Oberflächenantigene konnte gezeigt werden, daß der Prozeß der somatischen Hypermutation in Keimzentrums-B-Zellen aktiviert ist (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991; Küppers et al., 1993). Während dieses Prozesses werden neben Deletionen und Insertionen hauptsächlich Punktmutationen mit einer Rate von 10^{-3} - 10^{-4} /bp/Generation in umgelagerte V-Gene eingeführt (Goossens et al., 1998; Kocks and Rajewsky, 1989; McKean et al., 1984; Wilson et al., 1998). Diese Mutationen konzentrieren sich sowohl bei funktionellen als auch nicht-funktionellen Umlagerungen (Roes et al., 1989) auf einen Bereich von ca. 2 kbp zwischen V-Gen-Promotor und J-C-Intron (Both et al., 1990; Rada et al., 1994; Rogerson, 1994; Rothenfluh et al., 1993).

Weiterhin wurden durch Sequenzvergleiche verschiedener, mutierter Genumlagerungen Sequenzpräferenzen der somatischen Hypermutation deutlich: So werden Mutationen häufig in sogenannte "hot-spots" wie dem RGYW-Motiv (R: G + A, Y: C + T, W: A + T) gefunden (Betz et al., 1995; Neuberger and Milstein, 1995; Reynaud et al., 1995; Rogozin and Kolchanov, 1992; Steele, 1991). Zudem werden häufiger Transitionen (Purin → Purin und Pyrimidin → Pyrimidin) als Transversionen (Purin → Pyrimidin und Pyrimidin → Purin) eingeführt (Betz et al., 1995; Betz et al., 1993). Der Mechanismus der somatischen Hypermutation ist bislang noch nicht vollständig geklärt; unter anderem wurde gezeigt, daß Mutationen nur in transkribierte Gensegmente eingeführt werden und daß im Verlauf dieser Reaktion Strangbrüche in der DNA der Immunoglobulin- (Ig-) Loci entstehen (Bross et al., 2000; Fukita et al., 1998; Peters and Storb, 1996). Auch die Beteiligung von fehlerhaften DNA-Polymerasen wurde vermutet. So ist das Muster der somatischen Mutationen bei Patienten beeinflusst, die Defekte im Gen der DNA-Polymerase β besitzen (Zeng et al., 2001). Ferner konnte gezeigt werden, daß in Abwesenheit der Polymerasen β oder δ die somatische Hypermutationsaktivität in in vitro mutierenden Zelllinien eingeschränkt ist (Faili et al., 2002; Zan et al., 2001). Auch in transgenen Mäusen, welche Polymerase β -spezifische antisense RNA ausprägen, werden im Verlauf einer T-Zell abhängigen Immunantwort weniger somatische Mutationen in V-Genumlagerungen eingeführt (Diaz and Casali, 2002). In einer Reihe von Experimenten wurde weiterhin deutlich, daß somatische Hypermutation nur in Anwesenheit des Enzyms "activation-induced cytidine deaminase" (AID) stattfindet: Patienten, die Defekte im AID-Gen besitzen, sowie AID-defiziente Mäuse zeigen keine somatische Hypermutationsaktivität (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Darüber hinaus findet sowohl bei diesen Patienten als auch bei AID-defizienten Mäusen kein Klassenwechsel statt. Bemerkenswerterweise kann durch AID-Expression die somatische Hypermutationsaktivität und der Klassenwechsel auch in nicht B-Zellen wie z.B. Fibroblasten induziert werden (Okazaki et al., 2002; Yoshikawa et al., 2002). Daher scheint AID der einzige B-Zellspezifische Faktor zu sein, der für diese Prozesse

notwendig ist. AID zeichnet sich durch Homologie zu Proteinen aus, die Veränderungen in RNA-Molekülen nach der Transkription einführen (RNA Editing); die Wirkungsweise von AID ist allerdings bisher noch nicht vollkommen geklärt. Kürzlich erschienene Arbeiten deuten darauf hin, daß durch AID Cytosine der DNA zu Uracil desaminiert werden. Vermutlich werden anschließend Mutationen in die DNA eingeführt, indem die veränderte Base mittels Uracil-DNA-Glykosylasen entfernt wird und die entstandene abasische Stelle fehlerhaft aufgefüllt wird (Di Noia and Neuberger, 2002; Petersen-Mahrt et al., 2002; Rada et al., 2002).

Infolge der somatischen Hypermutation und der Proliferation im Keimzentrum zeichnen sich Mitglieder einzelner Klone von Keimzentrums-B-Zellen durch V-Genumlagerungen aus, die sich nur in einzelnen Mutationen von Umlagerungen der anderen Klonmitglieder unterscheiden (Abbildung 2). Diese intraklonale V-Gen-Diversität ist also charakteristisch für expandierende Keimzentrums-B-Zellklone (Jacob et al., 1991; Küppers et al., 1993). Weiterhin sind die Mutationen in den umgelagerten V-Genen Kennzeichen für den Entwicklungsstand der B-Zellen: Naive, antigenunerfahrene B-Zellen besitzen im Vergleich zu den Keimbahn-V-Genen unmutierte V-Gene. Im Gegensatz dazu sind Keimzentrums-B-Zellen und von ihnen abstammende Zellen (Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen) durch V-Gene charakterisiert, die sich in einzelnen somatischen Mutationen von den Keimbahn-V-Genen unterscheiden (Abbildung 2) .

Neben der Diversifizierung der Antikörper durch somatische Hypermutation findet in Keimzentren auch Klassenwechsel statt. Durch somatische Rekombination wird - unter Erhalt der V-Region - die C-Region der Schwereketten Gene durch eine andere C-Region ersetzt (Siebenkotten and Radbruch, 1995; Stavnezer, 1996). Da die C-Region die Effektorfunktionen des Antikörpers vermittelt, entsteht auf diese Weise ein Antikörper mit veränderter Effektorfunktion bei gleichbleibender Spezifität.

Für die Entstehung der Keimzentren sowie den Verlauf der Keimzentrumsreaktion spielt sowohl der CD40-Rezeptor also auch das Bcl-6 Molekül eine wichtige

Rolle. Der CD40-Rezeptor ist ein Oberflächenprotein, das zur Familie der Tumornekrosefaktoren-Rezeptoren gezählt wird (Locksley et al., 2001). Neben B-Zellen prägen Monozyten, dendritische Zellen, Endothelzellen und Epithelzellen den CD40-Rezeptor aus. Bcl-6, ein Transkriptionsrepressor, wird unter B-Zellen nur von Keimzentrums-B-Zellen ausgeprägt (Cattoretti et al., 1995; Onizuka et al., 1995). Translokationen des Bcl-6 Gens wurden in einer Reihe von B-Zell-Lymphomen beschrieben (Dalla-Favera et al., 1999). Durch folgende Beobachtungen wird deutlich, daß sowohl die CD40-CD40L-Interaktion sowie die Ausprägung des Bcl-6 Moleküls entscheidend zur Bildung der Keimzentren beitragen: Bei CD40-, CD40L- sowie Bcl-6-defizienten Mäusen ist die Bildung der Keimzentren blockiert (Dent et al., 1997; Kawabe et al., 1994; Xu et al., 1994). Weiterhin findet bei CD40- und CD40L-defizienten Mäusen nach Immunisierung mit Antigenen, die gewöhnlich eine Keimzentrumsreaktion auslösen, kein Klassenwechsel statt (Kawabe et al., 1994; Xu et al., 1994). Vergleichbare Symptome zeigen Patienten, die einen Defekt im CD40L-Gen besitzen (Hyper-IgM-Syndrom) (Notarangelo et al., 1992). In-vitro Experimente zeigten weiterhin, daß die Aktivierung des CD40-Rezeptors isolierte Keimzentrums-B-Zellen vor Apoptose schützt und daß der Kontakt zwischen CD40 und CD40L bei gleichzeitiger Stimulation durch Interleukin 2 und 10 die Differenzierung von Keimzentrums-B-Zellen beeinflusst: Keimzentrums-B-Zellen, bei denen der CD40-Rezeptor aktiviert wurde, entwickeln sich zu Gedächtnis-B-Zellen, wohingegen fehlende Aktivierung des CD40-Moleküls die Entstehung von Plasmazellen begünstigt (Arpin et al., 1995; Liu and Banchereau, 1997). Auch die Expression des Bcl-6 Moleküls beeinflusst wahrscheinlich die Entwicklung der Keimzentrums-B-Zellen, da Bcl-6 die Transkription von Blimp-1 inhibiert, einem für die Plasmazellendifferenzierung wichtigen Faktor (Shaffer et al., 2000).

Obwohl es offenkundig ist, daß die meisten B-Zellen mit mutierten V-Genumlagerungen von Keimzentrums-B-Zellen abstammen, deuten einige wenige, Arbeiten darauf hin, daß der Prozeß der somatischen Hypermutation nicht

uneingeschränkt von der Bildung der Keimzentren abhängig ist: So zeigen zum Beispiel Lymphotoxin α -defiziente Mäusen trotz fehlender Keimzentren somatische Mutationen in umgelagerten V-Gene (Matsumoto et al., 1996). Auch Patienten, die aufgrund eines Defekts im CD40L-Gen keine Keimzentren bilden (Hyper-IgM Syndrom, siehe oben), zeigen somatische Mutationen in V-Genen einiger B-Zellen (Weller et al., 2001). Eine kürzlich erschienene Arbeit weist desweiteren darauf hin, daß in CD95-defizienten, transgenen Mäusen, welche B-Zellen mit autoreaktivem Antikörper bilden, somatische Mutationen außerhalb der Keimzentren eingeführt werden (William et al., 2002). Es bestehen allerdings Zweifel, ob und in welchem Maße diese beschriebene somatische Hypermutationsaktivität außerhalb der Keimzentren zur Entstehung der B-Zellen mit mutierten V-Genumlagerungen beiträgt. So ist es nicht ausgeschlossen, daß bei Hyper-IgM-Patienten und Lymphotoxin α -defizienten Mäusen in einigen wenigen lymphatischen Geweben Keimzentren oder Keimzentrums-ähnliche Strukturen vorhanden sind, die in eingeschränktem Maße somatische Hypermutation erlauben. Weiterhin werden in den beiden beschriebenen Mausmodellen somatische Mutationen nur nach Immunisierung mit unphysiologisch-hohen Antigenkonzentrationen eingeführt. Zusammenfassend gibt es also Hinweise auf somatische Hypermutation, die außerhalb des Keimzentrums stattfindet; doch die direkten Belege für diesen Prozeß sind noch unzureichend.

1.3 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV), das im Jahr 1964 zum ersten Mal von Epstein, Achong und Barr in Zellkulturen des Burkitt's Lymphomes, einem in Zentralafrika und Neuguinea häufig auftretendem Tumor, nachgewiesen wurde (Epstein et al., 1964), wird aufgrund seiner Struktur den Herpesviren zugeordnet. Das Genom des Virus besteht aus einer linearen, doppelsträngigen, 184 kbp langen DNA, die mit Proteinen besetzt ist und von einem Nukleokapsid, einem Proteintegument sowie einer Membran umgeben wird (Kieff and Rickinson, 2001). Das Virus infiziert hauptsächlich B-Zellen und entwickelt in diesen eine lebenslange Persistenz (Rickinson and Kieff, 2001). Ferner wurde vornehmlich bei Tumoren die Infektion anderer Zellarten wie zum Beispiel Epithelzellen, T-Zellen und Leberzellen beschrieben; die regelmäßige Infektion dieser Zellen wird allerdings kontrovers diskutiert (Anagnostopoulos et al., 1995; Niedobitek et al., 1997; Sixbey et al., 1984; Sugawara et al., 1999; Tosato et al., 1984).

EBV infiziert B-Zellen, indem es zunächst über Interaktion des viralen Membranglykoproteins gp350/220 mit dem von B-Zellen ausgeprägten CD21 Protein (auch C3d-Komplementrezeptor genannt) Kontakt zu B-Zellen herstellt (Nemerow et al., 1985; Tanner et al., 1987). Nachdem das Virus auf diese Weise an die Zelloberfläche der B-Zelle gebunden hat, wird es durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Bei diesem Prozess spielt die Interaktion des viralen gH-gL-gp42-Komplexes mit dem HLA Klasse II Molekül der B-Zelle eine entscheidende Rolle (Haan et al., 2000; Haan and Longnecker, 2000). Anschließend gelangt die virale DNA in den Zellkern der infizierten B-Zelle und zirkularisiert zu einem Episom. In der Zelle kann EBV in zwei unterschiedliche Infektionsphasen eintreten: den lytischen und den latenten Zyklus (Kieff and Rickinson, 2001). Im lytischen Zyklus wird eine Vielzahl viraler Partikel gebildet und nach Zerstörung der infizierten Zelle freigesetzt. Im Verlauf der latenten Infektion entstehen hingegen keine infektiösen Partikel, das Virus verbleibt episomal in der infizierten Zelle.

Anhand der Ausprägung verschiedener viraler Genprodukte wird die Latenz in unterschiedliche Phasen (Latenzformen) untergliedert (Kieff and Rickinson, 2001). Während der **Latenz III** werden alle 12 latenten Gene des EBV ausgeprägt. Neben den nukleären Proteinen EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP ("EBV nuclear antigens") werden die Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B ("Latent membrane proteins") gebildet. Zusätzlich zu diesen Proteinen findet man verschiedene Transkripte, die wahrscheinlich nicht translatiert werden: BARTs ("BamHI A fragment rightward transcripts"), eine Familie von RNA-Molekülen, die durch alternatives Spleißen eines Transkriptes entstehen, und zwei nicht polyadenylierte, nicht gespleißte Transkripte, EBER1 und EBER2 ("EBV-encoded small RNAs"). Im Gegensatz zu dieser Latenzform III zeichnen sich die drei weiteren Latenzphasen durch eingeschränkte Genexpression der viralen latenten Gene aus (Rickinson and Kieff, 2001). Neben den Transkripten (EBER1, EBER2 und BARTs) werden in **Latenz II** die Proteine LMP1, LMP2A, LMP2B und EBNA1 und in **Latenz I** lediglich das Protein EBNA1 ausgeprägt. Ferner wurde eine Latenzform beschrieben während der nur die EBER-Transkripte, die BARTs, LMP2A und vielleicht auch EBNA1 gebildet werden (Chen et al., 1995; Miyashita et al., 1997; Tierney et al., 1994). Diese Latenzform wird im Folgenden **Latenz 0** genannt.

1.4 Die Wirkung einiger EBV-kodierter, latenter Genprodukte

EBV-kodierte Genprodukte greifen auf vielfältige Weise in den Zellzyklus und den Stoffwechsel infizierter Zellen ein. Für einige virale Proteine wurde zum Beispiel molekulares Mimikry festgestellt: Diese Genprodukte ahmen die Funktion menschlicher Proteine nach und können auf diese Weise die infizierten Zellen beeinflussen.

EBNA2 ist nicht nur der Hauptaktivator viraler, latenter Gene (wie LMP1, LMP2A, EBNA3A-3C) und bewirkt somit die Ausprägung der Latenz III, sondern reguliert auch eine Reihe zellulärer Gene (Zimmer-Strobl and Strobl, 2001). So wird durch EBNA2 unter anderem die Expression von c-myc aktiviert und die Transkription des

Schwerkettenlocus der Antikörpergene inhibiert (Jochner et al., 1996; Kaiser et al., 1999). Diese Wirkungen werden über Bindung an den Transkriptionsfaktor RBP-J κ vermittelt (Zimber-Strobl et al., 1994). RBP-J κ wird ubiquitär exprimiert und ist u.a. Teil der Notch-Signalwege, die in vielen Organismen wie auch dem Menschen bei der Embryogenese sowie der Differenzierung von Zellen eine wichtige Rolle spielen (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). So inhibiert die Expression von Notch1 die Differenzierung lymphatischer Vorläuferzellen zu B-Zellen und reguliert an mehreren Punkten die Entwicklung der T-Zellen (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999; Robey et al., 1996; Washburn et al., 1997). Da sowohl EBNA2 als auch aktiviertes Notch mit RBP-J κ interagieren, wurde vermutet, daß EBNA2 trotz fehlender ausgedehnter Sequenzhomologie aktiviertes Notch nachahmt. In einer Reihe von Experimenten konnte schließlich die Analogie von EBNA2 und aktiviertem Notch-Rezeptor in vielen Punkten bestätigt werden (Gordadze et al., 2001; Strobl et al., 2000). Wie Mutationsanalysen EBNA2-regulierten Promotoren zeigten, ist die Interaktion zwischen EBNA2 und RBP-J κ für die Transkription EBNA2-regulierter Gene notwendig jedoch nicht hinreichend (Kieff and Rickinson, 2001). So benötigt die Aktivierung des EBV-kodierten LMP1-Gens u.a. zusätzlich die Interaktion von EBNA2 mit PU-1, einem in B-Zellen exprimierten Transkriptionsfaktor (Johannsen et al., 1995).

LMP1 besitzt viele funktionelle Gemeinsamkeiten mit Mitgliedern der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie, zu der auch das CD40-Protein gezählt wird. So ist es nicht nur in der Lage, mit Molekülen der TRAF-Familie (Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierte Faktoren) zu interagieren, sondern aktiviert auch die NF κ B-, JAK-STAT und JNK-Signalwege (Gires et al., 1999; Kieser et al., 1997; Mosialos et al., 1995). Im Gegensatz zum CD40-Rezeptor ist LMP1 allerdings ein konstitutiv aktiver Rezeptor; die Interaktion mit einem Liganden ist für die Aktivierung der LMP1-abhängigen Signalwege nicht notwendig (Gires et al., 1997). In vielen Aspekten konnte die funktionelle Ähnlichkeit von LMP1 und aktiviertem CD40 Molekül durch in vitro Experimente gezeigt werden: So kann sowohl LMP1 als auch aktivierter

CD40-Rezeptor die JNK- und NF κ B-Signalwege aktivieren und die Proliferation infizierter B-Zellen induzieren (Kilger et al., 1998; Zimmer-Strobl et al., 1996). Auch im Mausmodell konnten die funktionellen Gemeinsamkeiten zum Teil bestätigt werden. In CD40-defizienten Mäusen werden keine Keimzentren gebildet und es findet weder Klassenwechsel noch Affinitätsreifung statt (siehe Abschnitt 1.2). Wird in diesen CD40-defizienten Mäusen das LMP1-Gen als B-Zell-spezifisches Transgen eingeführt, so kann der Klassenwechsel, nicht jedoch die Affinitätsreifung, wiederhergestellt werden (Uchida et al., 1999). Desweiteren wurden in diesen LMP1-exprimierenden Mäusen (CD40^{+/+} und CD40^{-/-}) keine Keimzentren gefunden (Uchida et al., 1999). Diese Ergebnisse legen nahe, daß LMP1 - über die zu CD40 analoge Wirkung hinaus - die Bildung von Keimzentren blockiert. LMP1 hat weiterhin die Fähigkeit, infizierte Zellen durch Induktion verschiedener anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2, A20 und Bfl-1 vor Apoptose zu schützen und in Kombination mit EBNA2, infizierte Zellen zur Proliferation zu treiben (Henderson et al., 1991; Kilger et al., 1998; Laherty et al., 1992; Wang et al., 1996). Aufgrund dieser Wirkung können Zelllinien humaner B-Zellen durch EBV-Infektion etabliert werden.

LMP2A besitzt wie der B-Zellrezeptor in seiner Signaldomäne ein sogenanntes ITAM-Motiv ("Immunoreceptor Tyrosine Activation Motifs") (Beaufils et al., 1993; Reth et al., 1991). Nach Phosphorylierung dieses Motivs erfolgt sowohl bei LMP2A als auch beim B-Zellrezeptor die Interaktion mit Protein-Tyrosin-Kinasen wie Syk (Miller et al., 1995). Im Gegensatz zum B-Zellrezeptor ist LMP2A jedoch unabhängig von einem Liganden aktiv und ahmt auf diese Weise einen konstitutiv aktiven B-Zellrezeptor nach (Beaufils et al., 1993; Longnecker and Kieff, 1990). So wurde in LMP2A-transgenen Mäusen gezeigt, daß LMP2A mit Signalen des B-Zellrezeptor interferiert und das Überlebenssignal des B-Zellrezeptors ersetzen kann: Durch LMP2A Expression können rezeptorlose B-Zellen überleben, die gewöhnlich aufgrund des fehlenden Signals des B-Zellrezeptors im Knochenmark durch Apoptose sterben sollten (Caldwell et al., 1998). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen viralen Proteinen ahmt EBNA1 kein

zelluläres Protein nach. In proliferierenden Zellen ist EBNA1 für die Replikation des viralen Genoms sowie für die Verteilung der Episome auf die Tochterzellen notwendig (Kieff and Rickinson, 2001). EBNA1 zeichnet sich durch Glycin-Alanin Wiederholungen aus, welche die endogene Prozessierung und Präsentation des Proteins durch Antigen-präsentierende Zellen und somit die Erkennung des Antigens durch zytotoxische T-Zellen verhindern (Levitskaya et al., 1995). Infizierte B-Zellen, die als einziges Protein EBNA1 ausprägen (Latenz I), können also nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt und eliminiert werden.

Die Wirkungsweise der EBER-Transkripte, die mit einer Kopienzahl von bis zu 10^7 Molekülen pro Zelle vorliegen, ist noch nicht vollständig geklärt. Diese Transkripte induzieren die Expression des Bcl-2 Gens und schützen somit infizierte Zellen vor Apoptose; auch eine tumorigene Wirkungen der EBER-RNAs wird diskutiert (Komano et al., 1999; Ruf et al., 2000). Ferner zeigten in-vitro Experimente, daß die EBER-Transkripte die Aktivierung der RNA-abhängigen Proteinkinase inhibieren, die ein Teil der intrazellulären, anti-viralen Antwort ist (Clarke et al., 1990a; Clarke et al., 1990b; Sharp et al., 1993).

1.5 Die primäre EBV-Infektion und die Persistenz des Virus

EBV infiziert über 95% der Bevölkerung weltweit und entwickelt in diesen Personen eine lebenslange Persistenz (Rickinson and Kieff, 2001). Während die Primärinfektion mit EBV bei Kindern gewöhnlich asymptomatisch verläuft, kann bei Primärinfektionen während oder nach der Pubertät in etwa der Hälfte der Fälle die Krankheit infektiöse Mononukleose (IM; auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt) entstehen (Henle et al., 1968). Der Grund für die unterschiedliche Symptomatik der Primärinfektion ist bisher noch nicht geklärt. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, daß sich Patienten mit symptomatischer und asymptomatischer Primärinfektion vor allem im T-Zellrepertoire unterscheiden (Silins et al., 2001). Während IM-Patienten starke oligoklonale Expansionen unter den zytotoxischen T-Zellen zeigen, wird die Diversität des

T-Zellrepertoires bei asymptomatischen Donoren beibehalten. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Immunreaktion der T-Zellen die Entstehung der Symptome der IM im starken Maße beeinflußt.

Nach Übertragung des Virus durch den Speichel kann es nach einer Inkubationszeit von vier bis sieben Wochen zum Ausbruch der IM kommen; über die Prozesse, die während der Inkubationszeit ablaufen, ist wenig bekannt. Im Verlauf der IM kommt es neben grippeähnlichen Symptomen, wie Fieber, Müdigkeit und Gliederschmerzen, zur Entzündung der Tonsillen und zur Schwellung einer Vielzahl von Lymphknoten (Rickinson and Kieff, 2001). Auch Störungen der Leberfunktion sowie Vergrößerung der Milz können in einigen Fällen auftreten. Die Lymphknoten und Tonsillen sind während der IM durch starke Nekrose und zumindest in späten Phasen der IM durch die Auflösung der Struktur der Keimzentren gekennzeichnet (Reynolds et al., 1995). In den Tonsillen können EBV-infizierte Zellen während der IM unterschiedliche Morphologien annehmen: Die meisten EBV-positiven Zellen sind kleine Lymphozyten, wenige sind größere Zellen (auch Blasten genannt) oder sogenannte Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS)-ähnliche Zellen, deren Phänotyp an den der Tumorzellen (HRS-Zellen genannt) des Morbus Hodgkin (MH) erinnern (Abschnitt 1.6; Anagnostopoulos et al., 1995; Isaacson et al., 1992; Reynolds et al., 1995). Diese HRS-ähnlichen Zellen der IM stellen wie die HRS-Zellen des MH große, CD30-positive Zellen dar, die entweder einkernig (sogenannte Hodgkin-Zellen) oder mehrkernig (sogenannte Reed-Sternberg-Zellen) sind. EBV-infizierte Zellen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Morphologie sondern auch in den ausgeprägten Latenzformen: Zellen in Latenz II sind überwiegend HRS-ähnliche Zellen sowie große infizierte Zellen; kleine EBV-infizierte Zellen liegen hingegen nicht in Latenz II sondern in anderen Latenzformen vor (Niedobitek et al., 1997). Unabhängig von der Morphologie handelt es sich bei dem überwiegenden Teil der infizierten Zellen um B-Zellen; doch auch die Infektion von Epithelzellen und T-Zellen wird diskutiert (Anagnostopoulos et al., 1995; Niedobitek et al., 1997; Sixbey et al., 1984; Tokunaga et al., 1993).

Während der IM ist etwa eine unter 10^4 der im Blut zirkulierenden B-Zellen mit EBV infiziert (Rickinson and Kieff, 2001). Es wird angenommen, daß EBV in dieser Phase der Infektion in der Mehrzahl der infizierten B-Zellen entweder Latenz III ausprägt oder in den lytischen Zyklus eintritt. Als Antwort auf die Ausbreitung des Virus findet eine oligoklonale Expansion zytotoxischer T-Zellen statt (Callan et al., 1996). In dieser Phase können über 40% der zytotoxischen T-Zellen gegen ein einziges Epitop des Virus gerichtet sein (Callan et al., 1998). Infolge dieser starken, EBV-spezifischen Immunantwort wird die Mehrzahl der infizierten Zellen eliminiert. Vermutlich können nur wenige infizierte B-Zellen diesem Prozeß entgehen, indem EBV in diesen Zellen Latenz I oder 0 ausprägt. Da während dieser Latenzformen keine oder nur geringfügig immunogene Proteine gebildet werden (Chen et al., 1995; Miyashita et al., 1997; Tierney et al., 1994), können diese infizierten Zellen nicht oder nur schwer von zytotoxischen T-Zellen erkannt und eliminiert werden. Auf diese Weise kann EBV eine lebenslange Persistenz entwickeln, während der ein Gleichgewicht zwischen infizierten B-Zellen (eine von 10^5 bis 10^6 peripheren B-Zellen) und Virus-spezifischen T-Zellen besteht (Miyashita et al., 1997).

Für diese virale Persistenz wurde die Infektion von B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien sowie die in diesen B-Zellen ausgeprägten Latenzformen untersucht (Babcock et al., 2000). Dazu wurden naive, Gedächtnis- und Keimzentrums-B-Zellen aufgrund des Expressionsmusters spezifischer Oberflächenantigene aus dem Blut und den Tonsillen latent infizierter Personen isoliert. Anschließend wurden für diese isolierten B-Zellpopulationen die Frequenz infizierter Zellen sowie die ausgeprägten Latenzformen EBV-kodierter Gene bestimmt. Diese Untersuchung zeigte, daß B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen unterschiedliche Latenzformen ausprägen: In der Tonsille zeigen naive B-Zellen die Latenzform III und Keimzentrums-B-Zellen sowie aktivierten Gedächtnis-B-Zellen Latenzform II. Im Blut sind hingegen ausschließlich Gedächtnis-B-Zellen infiziert, welche die Latenzform 0 zeigen. Basierend auf den Annahmen, daß EBV in allen direkt infizierten B-Zellen die Latenzform III ausprägt und

daß andere Latenzformen nur durch Differenzierung infizierter Zellen gebildet werden können, wurde folgendes Szenario entwickelt: In Tonsillen gehen während der Persistenz ständig einige wenige infizierte Plasmazellen oder möglicherweise auch Epithelzellen in den lytischen Zyklus über. Die auf diese Weise produzierten viralen Partikel infizieren naive B-Zellen, welche in Latenz III zur Proliferation getrieben werden (Babcock et al., 2000). Durch den Wechsel der Latenzform zu Latenz II und der damit verbundenen Herunterregulation der EBNA2-Expression können infizierte, naive B-Zellen zu Keimzentrums-B-Zellen differenzieren. Die in Keimzentrums-B-Zellen ausgeprägten EBV-kodierten Gene sind für das Überleben infizierter Keimzentrums-B-Zellen während der Selektion im Keimzentrum von zentraler Bedeutung: LMP1 ahmt aktivierten CD40-Rezeptor und somit die Interaktion mit antigenspezifischen T-Helferzellen nach; LMP2A imitiert in vielen Aspekten einen aktivierten B-Zellrezeptor und somit die Interaktion mit FDCs (Abschnitt 1.2 und 1.4; Babcock et al., 2000). Da Keimzentrums-B-Zellen sowohl durch den Kontakt mit FDCs als auch mit antigenspezifischen T-Helferzellen positiv selektioniert werden, können infizierte B-Zellen demzufolge unabhängig von der Selektion im Keimzentrum überleben. Schließlich gelangt das Virus durch Differenzierung infizierter Keimzentrums-B-Zellen in das Gedächtnis-B-Zellkompartiment. Einige der infizierten Gedächtnis-B-Zellen gelangen ins Blut und zeigen die Latenzform 0. Diesem Modell zufolge nutzt das Virus also die Prozesse der B-Zell-Entwicklung im Keimzentrum aus, um eine stabile Population infizierter Gedächtnis-B-Zellen zu bilden und in diesen langlebigen B-Zellen zu persistieren (Babcock et al., 2000). Da jedoch bei histologischen Untersuchungen während der Persistenz nur sehr selten Keimzentren mit EBV-positiven Zellen beschrieben wurden (Araujo et al., 1999; Kobayashi et al., 1998; persönliche Mitteilung Tilmann Spieker) und da die Bildung der Keimzentren in LMP1-transgenen Mäusen blockiert ist (Abschnitt 1.4; Uchida et al., 1999), wird dieses Modell, das eine Keimzentrumspassage EBV-infizierter Zellen postuliert, kontrovers diskutiert.

1.6 EBV-assoziierte Krankheiten

Die Mehrzahl der Patienten, die an der X-chromosomal vererbten Immunschwäche "X-linked-lymphoproliferative-syndrome" (XLP) leiden, stirbt bei der primären EBV-Infektion (Bar et al., 1974; Purtilo et al., 1975). Infolge eines Defektes im SAP-Gen reagiert das Immunsystem der Patienten nicht angemessen auf die Infektion mit EBV, so daß eine starke Expansion EBV-infizierter B-Zellen und eine starke Proliferation von T-Zellen als Antwort auf die Expansion infizierter B-Zellen stattfindet (Coffey et al., 1998; Nichols et al., 1998; Sayos et al., 1998). Vermutlich liegt dieser deregulierten Immunantwort u.a. folgender Prozeß zugrunde (Parolini et al., 2000): Durch Interaktion des 2B4-Rezeptors der natürlichen Killerzellen mit dem SAP-Protein wird bei gesunden Personen die antivirale Immunantwort dieser Killerzellen aktiviert. EBV-infizierte B-Zellen können infolge dieser Immunreaktion der natürlichen Killerzellen eliminiert werden, da sie den Liganden des 2B4-Rezeptors - CD48 - ausgeprägt. Der Defekt im SAP-Gen der XLP-Patienten verhindert allerdings die Eliminierung EBV-infizierter B-Zellen über diesem Mechanismus.

Neben den symptomatischen Primärinfektionen mit EBV - IM und XLP - wurde eine Vielzahl von EBV-assoziierten Krankheiten beschrieben (Rickinson and Kieff, 2001). Da es sich dabei vor allen Dingen um Tumore handelt, wird eine tumorigene Wirkung von EBV vermutet (Rickinson and Kieff, 2001). Die wichtigsten Beispiele EBV-assoziierte Lymphome sind das Burkitt-Lymphom (BL), das Posttransplantationslymphom immunsupprimierter Patienten (PTLD), der MH, einige T-Zell-Lymphome sowie das Nasopharynxkarzinom.

Für das BL wurde sowohl eine endemische Form, die hauptsächlich bei Kindern in Zentralafrika und Neuguinea auftritt, als auch eine sporadische Form beschrieben (Rickinson and Kieff, 2001). 15-25% der Tumore des sporadischen BL und wahrscheinlich sämtliche Fälle des endemischen BL sind mit EBV infiziert (Magrath, 1990; zur Hausen et al., 1970). Zudem wurde gezeigt, daß die viralen Episome aller Tumorzellen eines Patienten identisch sind (Neri et al., 1991). Da das EBV-Genom

nach der Infektion der B-Zellen zirkularisiert und dabei an den Verknüpfungsstellen der beiden Enden eine variable Anzahl von Sequenzwiederholungen eingeführt wird, kann diese Verknüpfungsstelle als klonaler Marker infizierter Zellen dienen. Demzufolge ist es wahrscheinlich, daß bei Tumoren wie dem BL, welche klonale EBV-Genome in allen Tumorzellen eines Patienten zeigen, schon die Vorläuferzellen der Tumore infiziert worden sind, und daß EBV bei der Entstehung des BL eine entscheidende Rolle spielt. Die Tumorzellen des BL, die durch Latenzform I charakterisiert sind, zeigen morphologische und phänotypische Ähnlichkeiten mit Keimzentrums-B-Zellen (Gregory et al., 1988; Rickinson and Kieff, 2001; Rowe et al., 1987). Desweiteren zeigen alle BL-Fälle eine deregulierte Expression des Protoonkogens c-myc infolge von Translokationen des c-myc-Gens in die Nähe eines Ig Locus (Rickinson and Kieff, 2001).

Bei Transplantationspatienten ist das Gleichgewicht zwischen EBV-infizierten Zellen und EBV-spezifischen T-Zellen aufgrund von Immunsuppression gestört. Infolge dessen gehen EBV-infizierten B-Zellen in die Latenzform III über und proliferieren ohne Kontrolle durch EBV-spezifische zytotoxische T-Zellen. Diese unkontrollierte Expansion EBV-infizierter B-Zellen kann schließlich zur Entstehung der PTLDs führen (Locker and Nalesnik, 1989; Shapiro et al., 1988).

Die Tumorzellen von etwa 50% der MH-Fälle sind mit EBV infiziert; dabei konnten in allen Tumorzellen der einzelnen Fälle jeweils klonale EBV-Genome nachgewiesen werden (Weiss et al., 1989). Daher wird vermutet, daß auch bei MH bereits die Tumovorläuferzellen mit EBV infiziert waren, und daß EBV bei diesen Fällen entscheidend an der Entwicklung des Tumors beteiligt ist. Die Rolle des Virus bei der Tumorentwicklung wird durch folgende Beobachtungen gestützt: Zum einen sind die Titer der EBV-spezifischen Antikörper bei einem signifikanten Teil der MH-Patienten schon drei Jahre vor Diagnose des MH erhöht (Gutensohn and Cole, 1980; Mueller et al., 1989). Zum anderen besitzen Personen, die eine IM hatten, ein zwei- bis viermal höheres Risiko, an MH zu erkranken (Alexander et al., 2000; Munoz et al., 1978;

Rosdahl et al., 1974). Die Tumorzellen des MH befinden sich in der Latenzform II (Herbst et al., 1991; Pallesen et al., 1991).

Neben diesen B-Zell-Lymphomen, die wahrscheinlich alle vom Keimzentrums-B-Zellen abstammen (Küppers et al., 1999), sind einige T-Zell-Lymphome mit EBV assoziiert: So sind zum Beispiel die Tumorzellen des nasalen T-Zell-Lymphoms in allen Fällen mit EBV infiziert (Harabuchi et al., 1990; Jones et al., 1988; Pallesen et al., 1993). Desweiteren konnte EBV-DNA in den Tumorzellen sämtlicher Fälle des Nasopharynxkarzinoms, einem in Asien gehäuft auftretenden epithelialen Tumor, nachgewiesen werden (Niedobitek et al., 1991). Die Tumorzellen des Nasopharynxkarzinoms und der T-Zell-Lymphome sind durch die Latenzform II charakterisiert (Chen et al., 1993; Minarovits et al., 1994; Niedobitek et al., 1991).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Über die Ausbreitung von EBV im B-Zellkompartiment während der IM ist bislang wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein detaillierteres Bild über das virale Infektionsverhalten, das proliferative Verhalten infizierter B-Zellen sowie die Differenzierung infizierter Zellen im Rahmen einer Keimzentrumsreaktion während der IM zu erhalten. Hierzu sollten neben der Charakterisierung der ausgeprägten Latenzformen einzelne EBV-infizierte Zellen durch Mikromanipulation aus tonsillären Gefrierschnitten isoliert und die V-Genumlagerungen dieser Zellen mittels Einzelzell-PCR-Analyse untersucht werden.

EBV-infizierte Zellen befinden sich während der IM in der Regel außerhalb von Keimzentren in der interfollikulären Region (IFR). Daher sollten im ersten Teil der Arbeit zunächst diese infizierten Zellen der IFR untersucht werden, um allgemeine virale Strategien zur Ausbreitung im B-Zellkompartiment während der IM zu charakterisieren.

Die Teilnahme infizierter B-Zellen an der Keimzentrumsreaktion scheint von zentraler Bedeutung für die Ausbreitung des Virus während der Persistenz zu sein (Abschnitt 1.5), obwohl EBV-infizierte Zellen während der Persistenz nur selten in Keimzentren zu finden sind. Um die Relevanz der Teilnahme EBV-infizierter Zellen an der Keimzentrumsreaktion für die Ausbreitung von EBV während der IM zu überprüfen, sollten im zweiten Teil der Arbeit EBV-infizierte Zellen aus Keimzentren von IM-Tonsillen untersucht werden.

Da bereits die Vorläufer der Tumorzellen mit EBV infiziert sind, spielt EBV wahrscheinlich bei der Entstehung mehrerer B-Zell-Lymphome eine entscheidende Rolle (Abschnitt 1.6). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher die Frage geklärt werden, ob EBV-infizierte Zellen der IM Charakteristika der möglichen EBV-infizierten Tumovorläuferzellen zeigen. Hierzu wurden die Latenzformen EBV-kodierter Gene sowie das Muster der somatischen Hypermutationsaktivität zwischen EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen und EBV-infizierten Zellen der IM verglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

Alle benutzten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, in Analyse-Qualität von den Firmen Fluka (Taufkirchen), Gibco BRL (Karlsruhe), Pharmacia (Freiburg) und Merck (Haar) bezogen.

2.1 Untersuchtes Gewebe und klinische Daten der Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden EBV-infizierte Zellen aus Tonsillen von IM-Patienten untersucht. Die verwendeten Tonsillen stammten aus routinemäßig durchgeführten Tonsillektomien der Hals-, Nasen- und Ohrenabteilung des St. Elisabeth Krankenhauses Hohenlind, Köln, und der Mayo Klinik, Rochester, USA. In allen Fällen liegt die Einwilligungserklärung der Patienten für die molekulare Analyse der entnommenen Tonsillen vor. Durch pathologische Untersuchungen wurde die Diagnose der IM in allen Fällen bestätigt. Nach Organentnahme wurden die Tonsillen zerteilt, in Einfriermedium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Niederlande) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Gefriermaterial bei -80°C gelagert.

Zur Untersuchung der Klonalität EBV-infizierter Zellen wurden Tonsillen von vier Patienten verwendet. Die Patienten 1 und 2 waren 15-jährige Frauen, die seit drei bzw. mehr als 14 Tagen an Symptomen der IM litten. Neben pathologischen Untersuchungen bestätigten in diesen beiden Fällen EBV-spezifische serologische Untersuchungen die Diagnose. Die Patienten 3 und 4 waren 16- bzw. 17-jährige Männer, bei denen sich seit vier Tagen bzw. zwei bis drei Wochen Symptome der IM zeigten. Mittels Immunhistochemie und in-situ Hybridisierung wurden Tonsillen von drei weiteren IM-Patienten untersucht: Ein 33-jähriger Mann zeigte seit zwei Wochen Symptome der IM, ein 20-jähriger Mann litt seit zwei bis drei Wochen an Symptomen der IM und eine 18-jährige Frau war seit 2 Tagen an IM erkrankt.

2.2 EBER in-situ Hybridisierung

Zur Identifikation EBV-infizierter Zellen wurde eine EBER1- und EBER2-spezifische, nicht radioaktive in-situ Hybridisierung durchgeführt. Diese von Niedobitek et al. für formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe beschriebene in-situ Hybridisierung (Niedobitek et al., 1992) wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung Digoxigenin-markierter Hybridisierungssonden sowohl für formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte angewandt als auch auf Gefrierschnitte übertragen.

Zur Vermeidung der Degradation der EBER-Transkripte durch RNasen wurden alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat behandelt (Sambrook and Russell, 2001) und Glaswaren, die vor und während der Hybridisierung benutzt wurden, für 12 Stunden bei 220°C gebacken.

Zur Durchführung der EBER in-situ Hybridisierungen (wie auch für die Immunhistochemie) wurden 7-10 µm dicke Gefrierschnitte auf Objektträger (Superfrost, Menzel, Braunschweig) aufgenommen, mindestens 30 Minuten (min) getrocknet und bei -80°C zur weiteren Verwendung gelagert. Vor Verwendung wurden die Gewebeschnitte für einige Minuten getrocknet, für drei min bei 90-93°C hitzefixiert und anschließend für 24 Stunden in 4%iger Paraformaldehydlösung bei 4°C fixiert. Nach mehrmaligem Waschen (PBS, 3 x 5 min) wurde das Gewebe für 10 min in 0,5 µg/ml Pronase (Roche, Mannheim) inkubiert, um gebundene Proteinen von den EBER-Transkripten zu entfernen. Nach erneutem Waschen (PBS, 2 x 5 min) wurden die Gewebeschnitte nachfixiert (20 min, 4% Paraformaldehyd in PBS), und erneut gewaschen (PBS, 3 x 5 min). In einer ansteigenden Alkoholreihe (30%, 70%, 90% und 100% Ethanol) wurden die Schnitte dehydriert und für einige Minuten an der Luft getrocknet. Daraufhin erfolgte die Hybridisierung mit 4-20 µg/ml Digoxigenin-gekoppelten, hitzedenaturierten Hybridisierungssonden (80°C, 10 min), welche in 25 µl Hybridisierungslösung (50% Formamid, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM Na₃PO₄, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA, 10% Dextransulfat, 1 x Denhardts Salz, 1 mg/ml Hefe tRNA) gelöst waren. Die Hybridisierung wurde bei 37°C für 18 Stunden in einer feuchten

Kammer (50% Formamid in 1 x SSC (0,15 M NaCl, 15 mM Natriumacetat)) durchgeführt. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Schnitte bei 37°C je zweimal für 5 min in 2 x SSC/50% Formamid sowie 0,1 x SSC/50% Formamid und 1 x TES (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl; pH 8,0) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 20 µg/ml RNase A (Roche) in TES für 20 min bei 37°C. Nach mehrmaligem Waschen (TES, 3 x 5 min) wurden die Gewebeschnitte je zweimal für 5 min in 2 x SSC und 0,1 x SSC sowie 1 x TBS (143 mM NaCl, 10 mM Tris-Base, pH 7-7,5) inkubiert. Zur Detektion EBER-positiver Zellen wurden die Schnitte zunächst für eine Stunde mit anti-Digoxigenin Fab-Fragmenten (Roche) inkubiert, an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Nach erneutem Waschen (TBS, 3 x 5 min) wurden EBER-exprimierende Zellen mit NBT/BCIP (DAKO, Hamburg) als Substrat der alkalischen Phosphatase sichtbar gemacht und die Kerne unspezifisch durch Hämalaun angefärbt.

Die Spezifität dieser EBER in-situ Hybridisierung wurde durch Verwendung von Sonden, welche die gleiche Sequenz wie die EBER-Transkripte besitzen und daher nicht an die EBER-Transkripte binden können, bestätigt.

2.3 Immunfärbungen

Die Immunhistochemie erfolgte entweder mit Hilfe von Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpern unter Verwendung der Avidin-Biotin-Komplex Technik (ABC-System, DAKO) oder mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Färbungen wurden zunächst an Zelllinien und/oder Gewebeschnitten etabliert, für welche die Expression der jeweiligen Proteine beschrieben worden ist; diese Zelllinien und/oder Gewebeschnitte wurden später parallel zu jeder Färbung als Positivkontrollen benutzt. Die Spezifität der Färbungen wurde durch Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper oder mit unspezifischen Sekundärantikörpern, sowie Färbungen von Gewebeschnitten, auf denen keine gefärbten Zellen erwartet werden, bestätigt.

2.3.1 Das ABC-System

Gewebeschnitte wurden über Nacht getrocknet und anschließend in Aceton fixiert (-20°C für 10 min). Nach Verdampfen des Acetons und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels einer 5%igen BSA-Lösung (bovine serum albumin) in TBS wurden die Schnitte 30-60 min mit Primärantikörper inkubiert (Tabelle 1). Nach mehrmaligem Waschen (TBS, 3 x 5 min) wurden die Schnitte 30-60 min mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus: E413, DAKO oder Schwein-anti-Kaninchen: E431 DAKO) inkubiert (Tabelle 1); durch erneutes Waschen (TBS, 3 x 5 min) wurde überschüssiger Sekundärantikörper entfernt. Anschließend erfolgte für 45 min die Inkubation mit Streptavidin-Biotin-gekoppelter alkalischer Phosphatase oder Streptavidin-Biotin-gekoppelter Peroxidase (DAKO). Nach mehrmaligem Waschen (TBS, 3 x 5 min) wurde die alkalische Phosphatase mit Fast Red (DAKO) und die Peroxidase mit DAB (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) sichtbar gemacht. Zur unspezifischen Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt.

Um CD30-positive HRS-ähnliche Zellen von anderen EBV-infizierten Zellen zu unterscheiden, wurde in einigen Versuchen eine Kombination aus anti-CD30 Immunfärbung und EBER in-situ Hybridisierung durchgeführt. Hierzu wurde das Gewebe hitzefixiert (90-93°C, 3 min) und für 12-15 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde die CD30 Immunfärbung wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei diente DAB als Substrat der Peroxidase. Zur Reduktion unspezifischen Hintergrundes sowie zur Vermeidung einer Degradation der EBER-Transkripte während der CD30 Immunfärbung wurden je Schnitt 100 µg Hefe tRNA sowie 16 U RNasin (Promega, Mannheim) zur Antikörperinkubation zugegeben. Die CD30-gefärbten Schnitte wurden erneut in 4% Paraformaldehyd fixiert und die EBER in-situ Hybridisierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur Färbung formalinfixierter und anschließend paraffineingebetteter Gewebe wurden die Schnitte zunächst mit Hilfe von Xylol entparaffiniert und in einer

absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 30% Ethanol) gewässert. Die anschließende Immunfärbung erfolgte wie oben beschrieben.

Tabelle 1. Verwendete Antikörper

Spezifität der Antikörper	Klon	Spezies/Isotyp	Konjugat	Hersteller/Referenz
<u>Primärantikörper</u>				
anti-CD30	BerH2	Maus/IgG1	-	DAKO
anti-CD20	L26	Maus/IgG2a	-	DAKO
anti-CD3	OKT3	Maus/IgG2a	-	Ortho Diagnostic
	-	Kaninchen	-	DAKO
anti-TCR α	α F1	Maus/IgG1	-	Endogene
anti-Bcl-6	PG-B6p	Maus/IgG1	-	Neomarkers
anti-LMP1	CS1-CS4	Maus/IgG1	-	DAKO
	S12	Maus/IgG	-	(Mann et al., 1985)
anti-EBNA2	R3, 1E6	Ratte/IgG2a	-	(Kremmer et al., 1995)
<u>Sekundärantikörper</u>				
anti-Maus	-	Kaninchen	Biotin	DAKO
anti-Kaninchen	-	Schwein	Biotin	DAKO
anti-Maus-IgG	-	Ziege	Alexa ⁵⁹⁴	Molecular Probes
anti-Ratte-IgG	-	Ziege	FITC	Santa Cruz

FITC: Fluorescein-Isothiocyanat

Hersteller: DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg; Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ, USA; Endogene, Massachusetts, USA; Neomarkers, Lab Vision Corporation, Fremont, USA; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; Santa Cruz, Heidelberg.

2.3.2 Fluoreszenzfärbungen

Zur Durchführung der Fluoreszenzfärbungen wurden Gefrierschnitte bei -20°C für 10 min acetonfixiert. Nach kurzem Waschen in PBS und Inkubation für 60 min in PBS/5%BSA erfolgte für 60 min die Inkubation mit den Primärantikörpern (Tabelle 1). Nach mehrmaligem Waschen (PBS, 3 x 5 min) wurden die Schnitte für 60 min mit den Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tabelle 1) an einem lichtgeschütztem Ort inkubiert. Nach erneutem Waschen (PBS, 3 x 5 min) wurden die Gewebeschnitte zur unspezifischen Anfärbung der Zellkerne für 10 min mit 140 ng/ml Hoechstfarbstoff (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich) inkubiert und in Polyvinylalkohol Eindeckelmedium mit DABCO eingedeckelt. Anschließend wurden die Schnitte bis zur mikroskopischen Analyse (Axiophot, Zeiss, Jena) bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

2.4 Isolierung EBV-infizierten Zellen mittels hydraulischer Mikromanipulation

Einzelne Zellen sowie Gruppen von 3-5 Zellen wurden mittels Mikromanipulation von gefärbten Schnitten (EBER in-situ Hybridisierung oder. Immunfärbung) isoliert (Küppers et al., 1997). Hierzu wurden gefärbte Zellen bei 600-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Inversmikroskopes (Olympus, Hamburg) identifiziert und unter Verwendung eines hydraulischen Mikromanipulators (Narishige, Japan) aus dem Gewebeverband gelöst. Die auf diese Weise mobilisierten Zellen wurden über eine Mikropipette, die an einen weiteren Mikromanipulator angeschlossen war, aufgesaugt (Küppers et al., 1997). Anschließend wurden die isolierten Zellen in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, in dem sich 20 µl PCR-Puffer (Expand™ High Fidelity, Roche) mit 1 ng/µl 5s rRNA (Roche) befanden. Die Lagerung der isolierten Zellen erfolgte bei -80°C.

2.5 Einzelzell-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Vor der Einzelzell-PCR-Amplifizierung wurden DNA-bindende Proteine, welche die Vervielfältigungsreaktion verhindern können, durch Inkubation mit 0,25 g/l Proteinase K (Proteinase K, PCR grade, Roche) bei 50°C für zwei Stunden abgebaut (Küppers et al., 1997). Die Proteinase wurde anschließend hitzeinaktiviert (95°C, 10 min).

2.5.1 Präamplifikation des gesamten Genoms einer Zelle (PEP)

Um die Analyse verschiedener Loci aus einzelnen Zellen zu ermöglichen sowie Material für spätere Untersuchungen zu bewahren, wurde für die Mehrzahl der untersuchten Zellen eine Voramplifizierung des gesamten Genoms (primer extension preamplification, PEP) durchgeführt. In wiederholenden PCR-Zyklen wurde unter Verwendung einer Mischung von 15 Basenpaar langen Oligonukleotiden (15-mer), welche alle möglichen Basenkombinationen enthalten, das gesamte Genom einer Zelle durchschnittlich 30 mal kopiert (Zhang et al., 1992).

Die PEP-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 60 µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 x PCR-Puffer A (Promega), 167 µM dNTPs, 33,3 µM

15-mer, 2,5 μM MgCl_2 und 5 Einheiten Taq DNA-Polymerase (Promega). Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten: 95°C für 10 min, eine Pause bei 80°C, in der das Enzym zugegeben wurde, 37°C für 2 min, Erhitzen auf 55°C in Schritten von 0,1°C pro Sekunde und 55°C für 4 min, gefolgt von 50 Zyklen von 95°C für 1 min, 37°C für 2 min, Aufheizen in Schritten von 0,1°C pro Sekunde auf 55°C und 55°C für 4 min.

Um mögliche Fehler der Taq DNA-Polymerase, die während der PEP-Reaktion eingeführt wurden, von der Analyse auszuschließen, wurden Sequenzunterschiede klonal verwandter Zellen nur dann als Mutationen gewertet, wenn sie wiederholt aus unabhängigen Aliquots der PEP-Reaktion erhalten wurden.

2.5.2 V-Gen-PCR

Die Amplifizierung umgelagerter Schwer- und Leichtkettengene einzelner Zellen wurde mit Hilfe von "semi-nested" PCRs durchgeführt (Küppers et al., 1993). Hierzu wurden Oligonukleotide (Primer) ausgewählt, welche für die V_H -, V_κ - und V_λ -Genfamilien sowie für J_H -, J_κ - und J_λ -Gene spezifisch sind (Tabelle 2). Mit Ausnahme der V_H L-Primer, welche an die DNA-Sequenz für die Leitpeptide der Antikörper hybridisieren, binden alle anderen V-Gen-Primer an die FRI der jeweiligen Antikörpergene. Da die ausgewählten Primer sowohl an die meisten als auch am häufigsten benutzten V-Gensegmente sowie an alle verwendeten J-Gensegmente binden, kann durch Verwendung dieser Primer die überwiegende Mehrzahl der möglichen V_H - und V_L -Genumlagerungen vervielfältigt werden. In der ersten Runde wurden alle V-Gen Oligonukleotide (V_H 1-6, V_H 1-5L, V_κ 1-9 oder V_λ 1-4) zusammen in einer Reaktion mit den 3' gelegenen J-Oligonukleotiden eingesetzt. In der zweiten Runde erfolgte dann die Aufspaltung der PCRs in separate Reaktionen für die einzelnen V_H -, V_H L-, V_κ - bzw. V_λ -familienspezifischen Primer. Um die Spezifität der PCRs zu erhöhen, wurden diese V-Primer mit Mischungen sogenannter 5'J-Primer kombiniert, welche im Vergleich zu den in der ersten Runde benutzten 3'J-Primern weiter stromaufwärts liegen.

Die erste Runde der Amplifizierung wurde entweder ohne PEP direkt nach Proteinase K-Reaktion im gleichen Reaktionsgefäß oder nach PEP mit 4 μl der PEP-Reaktion in

einem neuen Reaktionsgefäß durchgeführt. Ohne Voramplifizierung wurden in der ersten Runde ExpandTM High Fidelity DNA-Polymerasen Mischung und ExpandTM High Fidelity Puffer (Roche) benutzt, nach Voramplifizierung wurden in der ersten Runde Taq DNA-Polymerase und PCR-Puffer A (Promega) eingesetzt. In beiden Fällen wurde die erste Runde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt und enthielt je nach Ansatz die folgenden Bestandteile:

- 1. Runde zur Amplifizierung von V_H-Genen:

100 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 15 nM von jedem V_H- und 3'J_H-Primer und 2,5 Einheiten Polymerase.

- 1. Runde zur Amplifizierung von V_□-Genen:

100 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 15 nM von jedem V_□- und 3'J_□-Primer und 2,5 Einheiten Polymerase.

- 1. Runde zur Amplifizierung von V_□-Genen:

100 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 50 nM von jedem V_□- und 3'J_□-Primer und 2,5 Einheiten Polymerase.

- 1. Runde zur gleichzeitigen Amplifizierung von V_H- und V_□-Genen:

100 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 15 nM von jedem V_H-, V_□-, 3'J_H- und 3'J_□-Primer und 2,5 Einheiten Polymerase.

- 1. Runde zur gleichzeitigen Amplifizierung von V_{HL}- und V_□-Genen:

100 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 50 nM von jedem V_{HL}-, V_□-, 3'J_H- und 3'J_□-Primer und 2,5 Einheiten Polymerase.

Das PCR-Programm der ersten Runde bestand aus folgenden Schritten:

95°C für 2 min, 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min

35 Zyklen bestehend aus :

95°C 50 Sekunden (s), 60°C bzw 61°C für 30 s (Hybridisierungstemperatur: V_{\square} -PCR 61°C, sonst 60°C), 72°C für 1 min

Zum Abschluß der ersten Runde erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 72°C.

Die 2. Runde der PCRs erfolgte in separaten Ansätzen für die verschiedenen V-Genfamilien-spezifischen Oligonukleotide.

- 2. Runde zur Amplifizierung von V_H -Genen:

200 μ M dNTPs, 1 x PCR-Puffer (Gibco BRL), 1,5 mM $MgCl_2$, 125 nM des entsprechenden V_H -Primers, eine Mischung aus den vier 5' J_H -Primern (31 nM je 5' J_H -Primer) und 1,5 Einheiten Polymerase.

Bei einigen Experimenten wurde der im Vergleich zum V_H1 -Primer weiter stromaufwärts bindende V_H1N Primer benutzt. In diesen Fällen betrug die $MgCl_2$ Konzentration in der V_H1N -spezifischen zweiten Runde 2,5 mM.

- 2. Runde zur Amplifizierung von V_{\square} -Genen:

200 μ M dNTPs, 1 x PCR-Puffer (Gibco BRL), 1,5 mM $MgCl_2$, 125 nM des entsprechenden V_{\square} -Primers, eine Mischung aus den drei 5' J_{\square} -Primern (125 nM je 5' J_{\square} -Primer) und 1,5 Einheiten Polymerase.

- 2. Runde zur Amplifizierung von V_{\square} -Genen:

200 μ M dNTPs, 1 x PCR-Puffer (Gibco BRL), 2,5 mM $MgCl_2$, 125 nM des entsprechenden V_{\square} -Primers, eine Mischung aus den vier 5' J_{\square} -Primern (125 nM je 5' J_{\square} -Primer) und 1,5 Einheiten Polymerase.

- 2. Runde zur Amplifizierung von V_HL -Genen:

200 μ M dNTPs, 1 x PCR-Puffer (Gibco BRL), 2 mM $MgCl_2$ (bei V_H1L und V_H5L : 1,5 mM

MgCl₂), 125 nM des entsprechenden V_HL-Primers, eine Mischung aus den vier 5'J_H-Primern (31 nM je 5'J_H-Primer) und 1,5 Einheiten Polymerase.

Das PCR-Programm der 2. Runde setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

95°C für 2 min, 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min

45 Zyklen (40 Zyklen für V_HL-PCR) bestehend aus :

95°C 50 s, 61°C bzw 63°C für 30 s (Hybridisierungstemperatur: V_H- und V_□-PCR 61°C, V_□- und V_HL-PCR 63°C), 72°C für 1 min

Zum Abschluß der 2. Runde erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 72°C.

Tabelle 2. Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung	Referenz
V _H 1N	5'-CAG-TCT-GGG-GCT-GAG-GTG-AAG-A-3'	1. + 2. Runde	(Küppers et al., 2002)
V _H 1	5'-CCT-CAG-TGA-AGG-TYT-CCT-GCA-AGG-3'	1. + 2. Runde	(Kanzler et al., 1996b)
V _H 2	5'-GTC-CTR-CGC-TGG-TGA-AAC-CCA-CAC-A-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 3	5'-GGG-GTC-CCT-GAG-ACT-CTC-CTG-TGC-AG-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 4	5'-GAC-CCT-GTC-CCT-CAC-CTG-CRC-TGT-C-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 5	5'-AAA-AAG-CCC-GGG-GAG-TCT-CTG-ARG-A-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 6	5'-ACC-TGT-GCC-ATC-TCC-GGG-GAC-AGT-G-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 1L	5'-CTC-ACC-ATG-GAC-TGG-ACC-TGG-AG-3'	1. + 2. Runde	(Bräuninger et al., 1997)
V _H 2L	5'-TGC-TCC-ACR-CTC-CTG-CTR-CTG-A-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 3L	5'-ACC-ATG-GAG-TTT-GGG-CTG-AGC-TG-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 3.2L	5'-ACC-ATG-GAA-CTG-GGG-CTC-CGC-TG-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 4L	5'-CTC-CTG-GTG-GCA-GCT-CCC-AGA-T-3'	1. + 2. Runde	"
V _H 5L	5'-ATC-ATG-GGG-TCA-ACC-GCC-ATC-CT-3'	1. + 2. Runde	"
3'J _H 1.2.4.5	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-3'	1. Runde	(Kanzler et al., 1996b)
3'J _H 3	5'-ACC-TGA-AGA-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-3'	1. Runde	"
3'J _H 6	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-3'	1. Runde	"
5'J _H 1.4.5	5'-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-KCC-CTG-GCC-3'	2. Runde	"
5'J _H 2	5'-GAC-AGT-GAC-CAG-GGT-GCC-ACG-GCC-3'	2. Runde	"
5'J _H 3	5'-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-CCC-TTG-GCC-3'	2. Runde	"
5'J _H 6	5'-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-CCC-TTK-GCC-3'	2. Runde	"
V _□ 1	5'-GAC-ATC-CRG-WTG-ACC-CAG-TCT-CCW-TC-3'	1. + 2. Runde	"
V _□ 2	5'-CAG-WCT-CCA-CTC-TCC-CTG-YCC-GTC-A-3'	1. + 2. Runde	"
V _□ 3	5'-TTG-TGW-TGA-CRC-AGT-CTC-CAG-SCA-CC-3'	1. + 2. Runde	"
V _□ 4	5'-AGA-CTC-CCT-GGC-TGT-GTC-TCT-GGG-C-3'	1. + 2. Runde	"

3'J ₁ 1.2.4	5'-ACT-CAC-GTT-TGA-TYT-CCA-SCT-TGG-TCC-3'	1. Runde	"
3'J ₁ 3	5'-GTA-CTT-ACG-TTT-GAT-ATC-CAC-TTT-GGT-CC-3'	1. Runde	"
3'J ₁ 5	5'-GCT-TAC-GTT-TAA-TCT-CCA-GTC-GTG-TCC-3'	1. Runde	"
5'J ₁ 1.2	5'-TGG-ATY-TCC-ASC-TTG-GTC-CCY-TGG-C-3'	2. Runde	"
5'J ₁ 3	5'-TGG-ATA-TCC-ACT-TTG-GTC-CCA-GGG-C-3'	2. Runde	"
5'J ₁ 4	5'-TTG-ATC-TCC-ACC-TTG-GTC-CCT-CCG-C-3'	2. Runde	"
5'J ₁ 5	5'-TTA-ATC-TCC-AGT-CGT-GTC-CCT-TGG-C-3'	2. Runde	"
V ₁ 1	5'-GGT-CCT-GGG-CCC-AGT-CTG-TG-3'	1. + 2. Runde	(Bräuninger et al., 1999b)
V ₁ 2	5'-CAG-TCT-GCC-CTG-ACT-CAG-CCT-3'	1. + 2. Runde	"
V ₁ 3a	5'-CTC-AGC-CAC-CCT-CAG-TGT-CCG-T-3'	1. + 2. Runde	"
V ₁ 3b	5'-CTC-AGC-CAC-CCT-CCG-TGT-CAG-T-3'	1. + 2. Runde	"
V ₁ 4	5'-TTT-CTT-CTG-AGC-TGA-CTC-AGG-AC-3'	1. + 2. Runde	"
V ₁ 6	5'-GAG-TCT-CCG-GGG-AAG-ACG-GTA-3'	1. + 2. Runde	"
V ₁ 8	5'-ACT-GTG-GTG-ACC-CAG-GAG-CCA-3'	1. + 2. Runde	"
V ₁ 9	5'-GCT-GAC-TCA-GCC-ACC-TTC-TGC-A-3'	1. + 2. Runde	"
3'J ₁ 1	5'-GCC-ACT-TAC-CTA-GGA-CGG-TGA-C-3'	1. Runde	"
3'J ₁ 2.3	5'-GAA-GAG-ACT-CAC-CTA-GGA-CGG-TC-3'	1. Runde	"
3'J ₁ 6.7	5'-GGA-GAC-TYA-CCG-AGG-ACG-GTC-3'	1. Runde	"
5'J ₁ 1	5'-GGA-CGG-TGA-CCT-TGG-TCC-CAG-T-3'	2. Runde	"
5'J ₁ 2.3.7	5'-GAC-GGT-CAG-CTT-GGT-SCC-TCC-3'	2. Runde	"
5'J ₁ 6	5'-GAC-GGT-CAC-CTT-GGT-GCC-ACT-3'	2. Runde	"
EBNA1-F	5'-GGT-CGC-CGG-TGT-GTT-CGT-ATA-TGG-3'	1. + 2. Runde	
EBNA1-R	5'-GCG-GCA-GCC-CCT-TCC-ACC-ATA-G-3'	1. Runde	
EBNA1-Ri	5'-AGG-GAG-GCA-AAT-CTA-CTC-CAT-CGT-C-3'	2. Runde	
EBV-F	5'-GAGCTCTCCACAACAATGTTCCCTG-3'	1. + 2. Runde	
EBV-R	5'-CGGGGAATCCACAGACATCCGCTA-3'	1. Runde	
EBV-Ri	5'-GCTCCCCTGTGATTATTCCTCCTAA-3'	2. Runde	

Y = C und T; R = A und G; K = G und T; W = A und T; S = G und C

2.5.3 EBV-PCR

Um die Infektion der isolierten Zellen mit EBV zu überprüfen, wurden zwei EBV-spezifische PCRs etabliert. Bei einer dieser PCRs wird ein Stück des EBNA1-Gens vervielfältigt (EBV-Genom: Accession-Number AJ507799; PCR-Produkt der 1. Runde: Position 97170-97514; PCR-Produkt der 2. Runde: Position 97170-97486) und bei der anderen EBV-spezifischen PCR Fragment des LF2-Gens (EBV-Genom: Accession-Number AJ507799; PCR-Produkt der 1. Runde: Position 149108-149473; PCR-Produkt der 2. Runde: Position 149108-149444) (Primersequenzen siehe Tabelle 2). Die

Sensitivität dieser PCRs lag bei 1-2 EBV-Genomen pro Zelle; dies konnte durch die Analyse einzelner Zellen der Zelllinie Namalwa bestätigt werden, welche 1-2 Kopien des EBV-Genoms pro Zelle besitzt (Lawrence et al., 1988). Die erste Runde beider PCRs wird mit der ersten Runde der V_H-PCR kombiniert, die zweiten Runden erfolgen in separaten Reaktionen.

- 1. Runde der EBNA1-PCR:

100 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 15 nM der EBNA1F- und EBNA1R-Primer und 2,5 Einheiten Polymerase.

- 2. Runde der EBNA1-PCR:

200 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer (Gibco BRL), 1,5 mM MgCl₂, 125 nM der EBNA1F- und EBNA1Ri-Oligonukleotide und 1,5 Einheiten Polymerase.

Das PCR-Programm der zweiten Runde der EBNA1-PCR unterschied sich von dem zur Amplifizierung von V_H-Genumlagerungen nur in der Anzahl der Zyklen (35 Zyklen).

- 1. Runde der LF2-PCR:

100 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 15 nM der EBVF- und EBVR-Primer und 2,5 Einheiten Polymerase.

- 2. Runde der LF2-PCR:

200 µM dNTPs, 1 x PCR-Puffer (Gibco BRL), 1,5 mM MgCl₂, 125 nM der EBVF- und EBVRi-Oligonukleotide und 1,5 Einheiten Polymerase.

Das PCR-Programm der zweiten Runde dieser EBV-spezifischen PCR, mit der ein Teil des LF2 Gens amplifiziert wird, unterschied sich von dem zur Amplifizierung von V_H-Genumlagerungen nur in der Anzahl der Zyklen (35 Zyklen) und der Hybridisierungstemperatur (58°C).

2.5.4 Durchgeführte PCR-Analysen

Die folgenden PCR-Analysen wurden in Fall 1 und Fall 2 durchgeführt:

(1) 96 EBER⁺ Zellen, 37 LMP1⁺ Zellen, 22 HRS-ähnliche Zellen, 47 EBER⁻ Zellen, eine T-Zelle und 41 Pufferkontrollen des ersten Falls sowie 80 EBER⁺ Zellen, 70 HRS-ähnliche Zellen, 45 B-Zellen, 25 EBER⁻ Zellen, 47 T-Zellen und 54 Pufferkontrollen des zweiten Falls wurden nach PEP mit einer Kombination der V_H/V_□⁻ und EBNA1-Primer untersucht.

(2) 50 EBER⁺ Zellen, 50 HRS-ähnliche Zellen und 35 Pufferkontrollen des ersten Falls wurden nach PEP mit einer Kombination von V_H- und EBNA1-Primern analysiert.

(3) 91 HRS-ähnliche Zellen, 19 T-Zellen und 34 Pufferkontrollen des ersten Falls sowie 20 EBER⁺ Zellen, fünf B-Zellen, acht EBER⁻ Zellen, sechs T-Zellen und sechs Pufferkontrollen des zweiten Fall wurden ohne PEP mit einer Kombination der V_H/V_□⁻ und EBNA1-Primer untersucht.

(4) 47 HRS-ähnliche Zellen, 18 T-Zellen und 19 Pufferkontrollen des zweiten Falls wurden ohne PEP mit einer Kombination der V_HL/V_□⁻ und EBNA1-Primer untersucht.

(5) 30 EBER⁺ Zellen, 105 LMP1⁺ Zellen, 97 HRS-ähnliche Zellen, 39 B-Zellen, 15 T-Zellen und 61 Pufferkontrollen des ersten Falls wurden ohne PEP mit einer Kombination der V_H⁻ und V_□⁻-Primer untersucht.

(6) 120 EBNA2⁺ Zellen und 39 Pufferkontrollen des ersten Falls wurden ohne PEP mit den V_H-Primern untersucht.

(7) 140 EBNA2⁺ Zellen, 50 T-Zellen, und 42 Pufferkontrollen des zweiten Falls wurden nach PEP mit den V_H-Primern untersucht.

In Fall 3 wurden alle isolierten Zellen und Kontrollen nach PEP mit einer Kombination der V_H /V_□/V_□⁻ und der EBNA1-Primer untersucht. In Fall 4 wurden alle Proben nach PEP mit einer Kombination der V_H /V_□/V_□⁻ und der LF2-Primer untersucht. Für EBER⁺ Zellen wurden die V-Gen-PCRs nur dann durchgeführt, wenn für diese Zellen ein Produkt in der LF2-PCR erhalten worden war.

2.6 Sequenzanalyse

Die Produkte der PCR für V-Genumlagerungen (sowie exemplarisch Produkte der EBV-spezifischen PCRs) wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden der PCR-Produkte aus den Gelen ausgeschnitten und die DNA aufgereinigt (Qiaex II, Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden). Etwa 30 ng der DNA wurden mittels Big Dye Deoxy Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit und eines automatischen Sequenzierers (ABI 377, Applied Biosystems, Weiterstadt) direkt sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem DNASIS-Programm (Pharmacia) sowie der GenBank Datenbank und der V-BASE-Datenbank (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT.php?menu=901>).

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in drei Teile gliedern. Im ersten Teil wurden latent-infizierte Zellen, die sich in Morphologie und Expression EBV-kodierter Proteine unterschieden, aus Tonsillen von IM-Patienten isoliert und bezüglich ihrer V-Genumlagerungen charakterisiert. Durch diese Analyse sollte geklärt werden, ob B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (naive, Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen) von EBV infiziert werden und ob die Ausbreitung des Virus durch Proliferation infizierter Zellen erfolgt (Abschnitt 3.1.3.1).

Da die Keimzentrumsphase infizierter B-Zellen kontrovers diskutiert wird (Abschnitt 1.5), konzentrierte sich der zweite Teil der vorliegenden Arbeit auf die Charakterisierung EBV-infizierter B-Zellen, die sich in den histologischen Strukturen der Keimzentren von IM-Tonsillen befanden. Dazu wurden EBV-positive Zellen aus Keimzentren isoliert und die V-Genumlagerungen dieser Zellen untersucht, um Anzeichen für die Herkunft sowie die Teilnahme dieser Zellen an einer Keimzentrumsreaktion zu erhalten (Abschnitt 3.1.3.1). Zusätzlich wurde das Expressionsmuster EBV-kodierter Proteine dieser EBV-infizierten B-Zellen im Keimzentrum bestimmt.

Um Zellen mit Charakteristika von Tumorstadiumszellen unter EBV-infizierten Zellen der IM zu identifizieren, wurden im dritten Teil der Arbeit das Latenzprogramm sowie das Muster der somatischen Hypermutation EBV-infizierter B-Zellen der IM mit den jeweiligen Charakteristika der Tumorzellen EBV-assoziiierter Lymphome verglichen.

3.1 Untersuchung EBV-infizierter Zellen während der IM

3.1.1 Lokalisation EBV-infizierter Zellen in Tonsillen von IM-Patienten

Die Verteilung latent-infizierter Zellen wurde in Tonsillen von sechs Patienten, die seit 2 bis 21 Tage vor Entnahme der Tonsillen Symptome der IM zeigten, bestimmt (Patientendaten siehe Abschnitt 2.1), indem die Ausprägung der EBV-kodierten EBER-Transkripte in tonsillären Gefrierschnitten mittels EBER in-situ Hybridisierung nachgewiesen wurde. Da diese Transkripte in allen bisher beschriebenen, latent-infizierten B-Zellen exprimiert werden, können durch deren Nachweis sehr wahrscheinlich sämtliche latent-infizierten B-Zellen im Gewebe detektiert werden (Rickinson and Kieff, 2001). Dies konnte auch durch die Analyse EBER-negativer Zellen mittels EBV-spezifischer PCRs bekräftigt werden (Abschnitt 3.1.3.3 und 3.2.3).

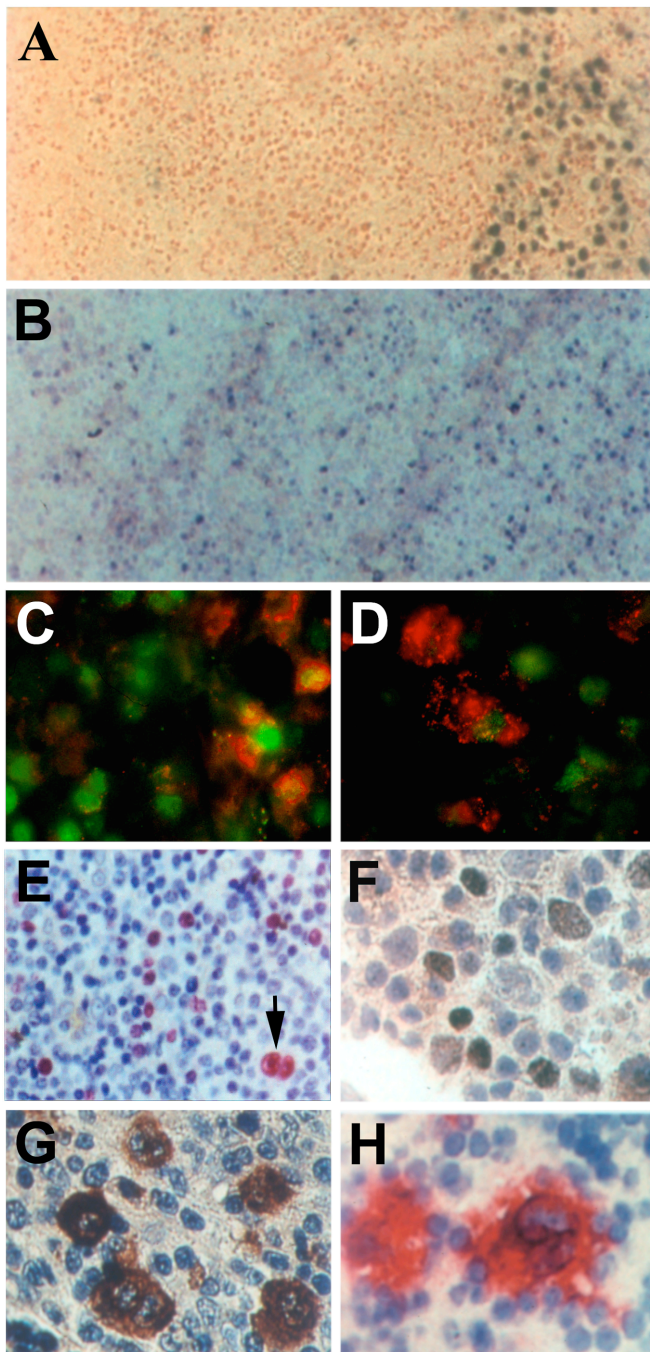
Diese Analyse zeigte, daß während der IM eine Vielzahl von Zellen durch EBV infiziert ist (Abbildung 3A und B). Diese EBV-positiven Zellen sind hauptsächlich außerhalb der Keimzentren in der sogenannten interfollikulären Regionen (IFR) zu finden; in den wenigen Keimzentren, die in Tonsillen der IM-Patienten vorhanden sind, befanden sich nur selten einzelne infizierte Zellen. Neben dieser hauptsächlich interfollikulären Verteilung EBV-infizierter Zellen wurde in fünf der sechs untersuchten Fälle eine Beschränkung EBV-positiver Zellen auf Teile der IFR offensichtlich (Abbildung 3A). Nur in einem Fall waren EBER-positive Zellen über den gesamten Schnitt verteilt (Abbildung 3B).

3.1.2 Immunhistochemische und morphologische Analyse EBV-infizierter Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die während der IM ausgeprägten Latenzformen durch eine immunhistochemische Untersuchung tonsillärer Schnitte charakterisiert sowie die Frequenzen der Zellen in den unterschiedlichen Latenzen bestimmt. Dazu wurde eine Doppelfärbung für die Expression der EBV-kodierten Proteine LMP1 und EBNA2 auf tonsillären Schnitten von vier IM-Patienten durchgeführt und die Anzahl der

gefärbten Zellen in 10-20 Gesichtsfeldern (bei gleicher Vergrößerung) ausgezählt. Anhand dieser Färbung wurde in Relation zur Anzahl EBV-infizierter, EBER⁺ Zellen auf Nachbarschnitten die Häufigkeit der Zellen in Latenz II (LMP1⁺/EBNA2⁻), in Latenz III (LMP1⁺/EBNA2⁺) und in Latenz I bzw. 0 (LMP1⁻/EBNA2⁻) bestimmt (Abschnitt 1.3; Abbildung 3A-D und Tabelle 3). Zellen in Latenz I können dabei nicht von Zellen in Latenz 0 unterschieden werden, da beide Latenzformen nur in der Expression von EBNA1 bzw. LMP2A variieren, gegen die bislang keine spezifischen Antikörper für immunhistochemische Analysen verfügbar sind. Darüberhinaus ist der Nachweis von Latenzformen nicht möglich, die nicht wie die klassischen, beschriebenen Latenzformen durch EBNA2 oder LMP1 (Abschnitt 1.3), sondern durch andere latente Genprodukte definiert sind. Als Negativkontrollen für diese Färbung dienten tonsilläre Schnitte, die von Patienten ohne Symptome der IM stammten; Positivkontrollen bildeten Zytozentrifugationspräparate EBV-infizierter Zelllinien, welche sowohl EBNA2 als auch LMP1 exprimieren. Diese Kontrollen bestätigten die Spezifität der Färbungen.

Abbildung 3. Lokalisation und phänotypische Charakterisierung EBV-infizierter Zellen



Färbungen wurden auf tonsillären Schnitten durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommen. Gegenfärbungen wurden für die Abbildungen (A), (B), (E) - (H) durchgeführt.

(A) + (B) Übersicht über Schnitte, die für die Expression der EBER Transkripte gefärbt sind (A: dunkel braune Färbung, B: dunkel blaue Färbung). Deutlich ist die lokale Begrenzung EBV-infizierter Zellen in Fall 1 (A) sowie die gleichmäßige Verteilung EBV-positiver Zellen in Fall 2 (B) zu sehen.

(C) + (D) Schnitt, der für die Expression von LMP1 (rote fluoreszente Färbung) und EBNA2 (grüne fluoreszente Färbung) gefärbt ist. Zellen mit folgenden Expressionsmustern sind zu sehen: $LMP1^+/EBNA2^-$, $LMP1^+/EBNA2^+$ sowie $LMP1^-/EBNA2^+$.

(E) Schnitt, auf dem die Ausprägung der EBER-Transkripte nachgewiesen wurde (rote Färbung). Die morphologische Varianz EBV-infizierter Zellen ist zu sehen: Neben einer zweikernigen HRS-ähnlichen Zelle (Pfeil) sind viele kleine infizierte Zellen dargestellt.

(F) Schnitt, der für EBNA2-Expression gefärbt ist (braune Färbung); die meisten $EBNA2^+$ Zellen sind kleine Zellen.

(G) Schnitt, der die Ausprägung des LMP1-Proteins gefärbt ist (braune Färbung). $LMP1^+$ HRS-ähnliche Zellen sind zu sehen.

(H) HRS-ähnliche Zelle auf einem für die Expression von CD30 gefärbten Schnitt (rote Färbung).

Tabelle 3. Latenzformen und Morphologie EBV-infizierter Zellen

Expression von			Latenz	Morphologie	Frequenz unter EBER ⁺ Zellen ^a [%]
EBER	LMP1	EBNA2			
+			0 oder I	kleine Zellen	< 10
+	+		II	große Zellen (Blasten) und HRS-ähnliche Zellen ^b	20-30
+	+	+	III	kleine Zellen HRS-ähnliche Zellen (selten) ^b	10-20
+		+	IV	kleine Zellen	50-60

^aDiese Werte zeigten Schwankungen bei den vier untersuchten Fällen: EBER⁺, LMP1⁻, EBNA2⁻: 1-10%, EBER⁺, LMP1⁺, EBNA2⁻: 7-51%, EBER⁺, LMP1⁺, EBNA2⁺: 5-16% und EBER⁺, LMP1⁻, EBNA2⁺: 53-92%.

^bDiese Daten beruhen auf den Ergebnissen von Einzelfärbungen für EBNA2 bzw. LMP1, da HRS-ähnliche Zellen bei der LMP1-EBNA2-Fluoreszenzfärbungen nicht eindeutig anhand der typischen Morphologie identifiziert werden können. Da alle HRS-ähnlichen Zellen LMP1 exprimieren und weniger als 5% der HRS-ähnlichen Zellen EBNA2-positiv waren, befand sich die Mehrheit der HRS-ähnlichen Zellen in Latenz II und weniger als 5% der HRS-ähnlichen Zellen wahrscheinlich in Latenz III.

Diese Analyse ergab folgende Frequenzen der Zellen in den verschiedenen Latenzformen: Weniger als 10% der EBER⁺ Zellen bildeten weder LMP1 noch EBNA2 aus (Latenz I oder 0), 20-30% der EBER⁺ Zellen (1-20 Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld) prägten LMP1 aber nicht EBNA2 aus (Latenz II) und 10-20% der EBER⁺ Zellen (1-10 Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld) exprimierten LMP1 und EBNA2 (Latenz III) (Tabelle 3). Bemerkenswerterweise prägte in allen untersuchten Fällen die Mehrzahl latent-infizierter Zellen (10-40 Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld) EBNA2 jedoch nicht LMP1 aus (Tabelle 3). Dieses Latenzmuster wird im Folgenden Latenz IV genannt. Die Häufigkeit der Zellen in unterschiedlichen Latenzformen zeigte starke Schwankungen zwischen den vier untersuchten Fällen (siehe Legende zu Tabelle 3). Diese Schwankungen resultieren wahrscheinlich aus der z. T geringen Anzahl der Zellen, die bei einigen Fällen in den unterschiedlichen Latenzformen

detektiert wurden. Unabhängig von diesen Schwankungen ist in allen untersuchten Fällen Latenz IV (LMP1⁻, EBNA2⁺) die am häufigsten nachgewiesene Latenzform; in der Mehrzahl der infizierten Zellen wurde dieses Expressionsmuster EBV-kodierter Gene bei Verwendung von zwei unterschiedlichen, LMP1-spezifischen Antikörpern gefunden.

Die Untersuchung zeigte ferner eine Assoziation zwischen den Latenzformen und der Morphologie EBV-infizierter Zellen: Kleine EBV-positive Zellen befanden sich in Latenz I, III oder IV. Große Zellen, die auch als Blasten bezeichnet werden, sowie HRS-ähnliche Zellen zeigten Latenz II; selten befanden sich HRS-ähnliche Zellen (<5% der HRS-ähnlichen Zellen) in Latenz III. 1-5% EBV-infizierter Zellen exprimierten das CD30-Antigen und besaßen die Morphologie HRS-ähnlicher Zellen.

3.1.3 PCR-Analyse einzelner mikromanipulierter EBV-infizierter Zellen

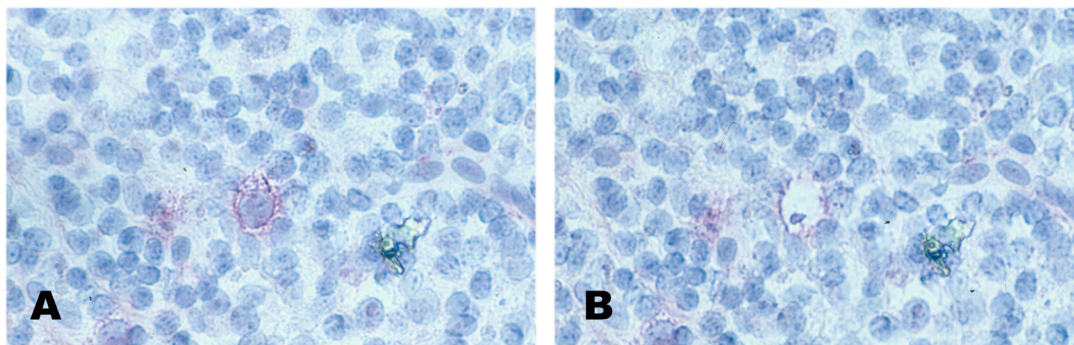
3.1.3.1 Schlußfolgerungen, die aufgrund von V-Gen-Analysen gezogen werden können

Aufgrund von V-Gen-Analysen einzelner B- Zellen können folgende Aussagen getroffen werden: Da V-Genumlagerungen klonale Marker der B-Zellen darstellen (Abschnitt 1.1), kann durch den Vergleich der erhaltenen V-Gensequenzen die klonale Verwandtschaft analysierter Zellen untersucht werden. Desweiteren kann der Differenzierungsstand isolierter Zellen durch den Vergleich der erhaltenen V-Gensequenzen untersuchter B-Zellen mit den bekannten Keimbahn-V-Genen bestimmt werden: Naive B-Zellen sowie Keimzentrums-Gründer-B-Zellen besitzen unmutierte V-Genumlagerungen, wohingegen Keimzentrums-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen durch mutierte V-Genumlagerungen charakterisiert sind (Abschnitt 1.2). Schließlich kann durch diese Analyse die Teilnahme von B-Zellen an einer Keimzentrumsreaktion überprüft werden: Aufgrund der Einführung von Mutationen während der Proliferation im Keimzentrum sind die im Verlauf der Keimzentrumsreaktion entstehenden Klone durch intraklonale V-Gen-Diversität gekennzeichnet (Abschnitt 1.2).

3.1.3.2 Untersuchte Subpopulationen EBV-infizierter Zellen

Zellen der oben beschriebenen Subpopulationen EBV-infizierter Zellen (Abschnitt 3.1.2) wurden in zwei IM-Fällen aus tonsillären Gefrierschnitten mittels Mikromanipulation isoliert (Abbildung 4) und auf V-Genumlagerungen analysiert. Diese beiden untersuchten Fälle wurden so ausgewählt, daß sie sich in der Dauer der IM vor Tonsillektomie sowie in dem beschriebenen Verteilungsmuster EBV-infizierter Zellen in der IFR unterschieden (Abschnitt 3.1.1). In Fall 1 erfolgte die Tonsillektomie drei Tage nach Auftreten der Symptome; infizierte Zellen befanden sich in vier distinkten Regionen der IFR (Abbildung 3A). In Fall 2 wurde die Tonsillektomie mehr als 14 Tage nach Auftreten der Symptome durchgeführt; EBV-infizierte Zellen waren gleichmäßig über die IFR verteilt (Abbildung 3B).

Abbildung 4. Mikromanipulation einer einzelnen HRS-ähnlichen Zelle



Biopsie einer IM-Tonsille mit einer CD30⁺ HRS-ähnlichen Zelle in der Mitte des Bildes (A) vor und (B) nach der Isolation. Gefrierschnitt, anti-CD30-Färbung, Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.

Im ersten Fall wurden EBER⁺ Zellen (Gesamtpopulation EBV-infizierter Zellen), LMP1⁺ Zellen (Zellen in Latenz II und III; hauptsächlich große Zellen und HRS-ähnliche Zellen) sowie EBNA2⁺ Zellen (Zellen in Latenz III und IV, hauptsächlich kleine Zellen) mikromanipuliert (Tabelle 4). Desweiteren wurden in Fall 1 HRS-ähnliche Zellen aufgrund der Ausprägung des CD30-Antigens und der charakteristischen Morphologie isoliert. Im zweiten Fall sollten kleine EBV-infizierte Zellen und HRS-ähnliche Zellen getrennt voneinander untersucht werden. Daher wurden Schnitte für die Ausprägung

der EBER-Transkripte und des CD30-Antigens gefärbt, das von HRS-ähnlichen Zellen nicht jedoch von kleinen, infizierten Zellen exprimiert wird. Anschließend wurden kleine CD30⁻, EBER⁺ Zellen (Gesamtpopulation EBV-infizierter Zellen ohne HRS-ähnliche Zellen) isoliert. Desweiteren wurden EBNA2⁺ Zellen und aufgrund der typischen Morphologie und der Expression des CD30-Antigens HRS-ähnliche Zellen isoliert (Tabelle 4).

3.1.3.3 PCR-Analyse

Die mikromanipulierten Zellen (Abschnitt 3.1.3.2) wurden mittels Einzelzell-PCR auf V_H- und V_κ-Genumlagerungen untersucht. V_κ-Gene wurden in diesem Teil der Arbeit nicht analysiert, da nicht-funktionelle V_κ-Genumlagerungen in κ⁺-ausprägenden Zellen gewöhnlich von der somatischen Hypermutation ausgenommen sind und folglich auch nach Keimzentrumspassage unmutiert sein können (Goossens et al., 2001).

Um die Infektion der isolierten Zellen mit EBV zu überprüfen, wurden einige EBV-infizierte Zellen für die Anwesenheit des EBV-kodierten EBNA1-Gens analysiert. Aus den meisten der untersuchten Zellen, von denen auch eine V-Genumlagerung amplifiziert wurde, wurde dieses EBV-spezifische PCR-Produkt erhalten (Tabelle 4). Demzufolge wurde die EBV-Infektion in der überwiegenden Mehrheit informativer Zellen d.h. Zellen, von denen mindestens eine V-Genumlagerung erhalten wurde, bestätigt.

Als Positivkontrollen für die V-Gen Analyse dienten Gruppen von ein bis drei B-Zellen (Tabelle 4). Diese B-Zellen wurden aus angrenzenden Schnitten mikromanipuliert, die für die Expression des B-Zellmarkers CD20 gefärbt waren. Durch diese Positivkontrollen wurde die Verlässlichkeit der Einzelzell-PCR demonstriert, da die Effizienz der Ig-Genamplifikation für diese Kontrollen (V_H-PCR: 24%) im Bereich der für mikromanipulierte Zellen beschriebenen Werte lag (Küppers et al., 1993). Ferner wurden aus diesen Positivkontrollen viele unterschiedliche V-Genumlagerungen der verschiedenen V-Genfamilien erhalten und die Häufigkeit der amplifizierten V-Genfamilien stimmte mit in der Literatur beschriebenen Werten überein (Brezinschek et al., 1995; Brezinschek et al., 1997).

Die geringe Amplifikationseffizienz einiger untersuchter Subpopulationen EBV-infizierter Zellen (insbesondere der EBNA2⁺ Zellen des zweiten Falls; Tabelle 4) ist wahrscheinlich durch technische Probleme wie z.B. DNA-Degradation auf einzelnen Schnitten begründet. Es ist ebenfalls denkbar, daß diese Subpopulationen nur zu einem geringen Teil aus B-Zellen bestanden. Für die EBNA2⁺ Zellen des zweiten Falls konnte diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen werden, da in diesem Fall über 90% der EBER⁺ Zellen EBNA2 exprimierten (Daten nicht gezeigt) und die Ig-Gen Amplifikationseffizienz der EBER⁺ Zellen (V_H-PCR: 20%) in dem erwarteten Bereich lag.

Als Negativkontrollen für die verschiedenen Schritte der Analyse dienten folgende Ansätze: i) Aliquots des vorgelegten Puffers, in den die isolierten Zellen überführt wurden, sowie Wasserkontrollen für die erste und zweite Runde der PCR zur Kontrolle der Kontamination durch DNA früherer Experimente, ii) Aliquots des Puffers, der während der Mikromanipulation die Schnitte bedeckte (Pufferkontrolle genannt), zur Kontrolle der Kontamination des Puffers mit DNA des Gewebes oder mit DNA früherer Experimente und iii) Gruppen EBER⁻ Zellen sowie einzelne CD3⁺ T-Zellen, die aus angrenzenden Gefrierschnitten beider Fälle isoliert wurden, zur Kontrolle der zellulären Kontamination während der Isolierung der Zellen. Nur von wenigen Pufferkontrollen sowie CD3⁺ T-Zellen bzw. EBER⁻ Zellen (1-4%) wurden V-Genumlagerungen bzw. das EBV-spezifische PCR-Produkt erhalten (Tabelle 4). Demzufolge lag bei diesen wenigen Proben vermutlich eine zelluläre Kontamination vor. Trotz dieser geringfügigen Kontamination wird die Verlässlichkeit der Ergebnisse durch folgende Punkte bekräftigt: a) die vielfach höhere Frequenz der V-Gen PCR-Produkte, die von EBV-infizierten Zellen im Vergleich zu den Negativkontrollen erhalten wurden (20-34% im Vergleich zu 1-4%; zu EBNA2-positiven Zellen siehe Abschnitt 3.1.3.3), b) die geringe Frequenz der EBV-spezifischen PCR-Produkte, die von EBER⁻ Proben und Pufferkontrollen (1%) erhalten wurden und c) die Tatsache, daß aus fast allen EBV-positiven Zellen, aus denen eine V-Genumlagerung amplifiziert werden konnte, auch ein EBV-spezifisches PCR-Produkt erhalten wurde (Tabelle 4).

Tabelle 4. PCR-Analyse einzelner EBV-infizierter Zellen von zwei Patienten mit IM

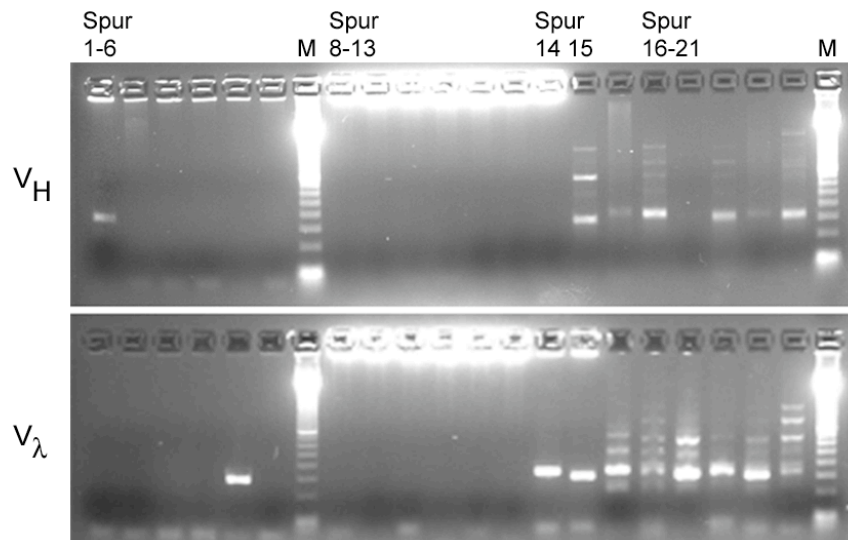
Fall, Zelltyp	Anzahl untersuchter Zellen/Proben	Anzahl der V-Genumlagerungen		Anzahl EBV-PCR positiver Zellen ^a
		V _H	V _□	
<u>Fall 1</u>				
EBER ⁺ ^b	176 ^d	60	6	52/56
LMP1 ⁺	142	36	6	3/3
EBNA2 ⁺	120 ^d	20	n.a.	n.a.
HRS-ähnl. Zellen	260 ^d	72	24	35/36
alle	698	224		90/95
<u>Fall 2</u>				
EBER ⁺ ^b	100	20	8	26/26
EBNA2 ⁺	140 ^d	13	n.a.	n.a.
HRS-ähnl. Zellen	117	31	7	23/28
alle	367	79		49/54
Kontrollen				
<u>Fall 1 und 2</u>				
B-Zellen ^c	89	22	9	14/50
EBER ⁻ ^c	80	n.a.	n.a.	1/80
T-Zellen ^c	156 ^d	7	3	6/91 ^f
Pufferkontrollen	331 ^d	4 ^e	1	1/189

n.a.: nicht analysiert ^aEBV-infizierte Zellen wurden nur dann mit Hilfe der EBNA1-PCR analysiert, wenn von diesen Zellen V-Genumlagerungen amplifiziert worden waren. Kontrollen wurden jedoch unabhängig von den Ergebnissen der V-Gen-PCRs mit Hilfe der EBV-spezifischen PCR untersucht. ^bIn Fall 1 repräsentieren EBER⁺ Zellen die Gesamtpopulation EBV-infizierter Zellen inklusive HRS-ähnlicher Zellen. In Fall 2 repräsentieren EBER⁺ Zellen die Gesamtpopulation EBV-infizierter Zellen ohne HRS-ähnliche Zellen. ^c CD3⁺ T-Zellen und CD20⁺ B-Zellen wurden von angrenzenden Schnitten isoliert. Gruppen von 1-3 CD20⁺ B-Zellen oder EBER⁻ Zellen wurden in Reaktionsgefäße überführt. Die Anzahl der Zellen ist angegeben. ^d50 EBER⁺ Zellen, 120 EBNA2⁺ Zellen, 50 HRS-ähnliche Zellen und 74 Pufferkontrollen des ersten Falls sowie 140 EBNA2⁺ Zellen, 50 T-Zellen und 42 Pufferkontrollen des zweiten Falls wurden nur auf V_H-Genumlagerungen analysiert. Alle anderen Proben wurden auf V_H- und V_□-Genumlagerungen untersucht. ^eEine Sequenz, die aus einer Pufferkontrolle erhalten wurde, ist identisch zu einer klonalen V_H3-Genumlagerung, die von 22 weiteren Zellen erhalten wurde. Alle anderen V-Gene, die von Kontrollen amplifiziert wurden, sind nicht verwandt mit Umlagerungen EBV-infizierter Zellen. ^fDie Amplifikation von EBNA1-Fragmenten in 6 der 71 T-Zellen ist vereinbar mit der Infektion von T-Zellen.

3.1.4 Naive, Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen sind EBV-infiziert

Im ersten Fall wurden 698 Zellen auf V_H - und V_{λ} -Genumlagerungen untersucht (Tabelle 4). Von 203 dieser EBV-infizierten Zellen wurden 224 V-Genumlagerungen amplifiziert (Abbildung 5 zeigt ein exemplarisches Gelphoto; Tabelle 4) und sequenziert.

Abbildung 5. Agarosegelphoto von PCR-Produkten einer V_H - und einer V_{λ} -PCR



Die Abbildung zeigt exemplarisch ein Agarosegelphoto mit Produkten einer PCR für V_H -Genumlagerungen (obere Reihe) und einer PCR für V_{λ} -Genumlagerungen (untere Reihe). Neben einer mikromanipulierten $EBER^+$ Zelle (Spuren 1-6: V_H1-6 bzw. $V_{\lambda}1-9$) wurden eine Pufferkontrolle (Spuren 8-13: V_H1-6 bzw. $V_{\lambda}1-9$) sowie zwei Einzelzellen einer Zelllinien mit bekannten Genumlagerungen (Spuren 14+15; obere Reihe V_H1 und V_H3 , untere Reihe $V_{\lambda}1$ und $V_{\lambda}3$) analysiert. Isolierte DNA polyklonaler B-Zellen (Spuren 16-21) diente als Positivkontrolle für die zweite Runde der PCRs. Die untersuchte $EBER^+$ Zelle besaß eine V_H1 - und eine $V_{\lambda}6$ -Genumlagerung. Anhand der 100 bp-Leiter (Spur 7 und 22) kann die Länge der PCR-Produkte abgeschätzt werden. V_H - und V_{λ} -Genumlagerungen besitzen in der Regel eine Länge von 300-400 bp. Die Sequenzierung längerer PCR-Produkte der V_H -PCR zeigte, daß diese Produkte der V_H -PCR durch Anlagerung der J_H -Gen-Primer an J_H -Gensegmente entstehen, die im Vergleich zum umgelagerten J_H -Gensegment weiter 3' liegen (siehe Abschnitt 1.1). Die Sequenzierung längerer PCR-Produkte der V_{λ} -PCR zeigte, daß es sich um unspezifische Produkte handelte, die durch Kreuzreaktion der Primer entstehen.

Die V-Gen-Sequenzanalyse der unterschiedlichen Subpopulationen ($EBER^+$, $LMP1^+$, $EBNA2^+$ und HRS-ähnliche Zellen) zeigte, daß durchschnittlich 96% der Zellen durch mutierte und 4% der Zellen durch unmutierte V-Gene charakterisiert sind (Tabelle 5). Die durchschnittlichen Mutationsfrequenzen mutierter V_H - und V_{λ} -Genumlagerungen

(6,3% für V_H - und 3,9% V_κ -Gene; Tabelle 5) lagen im Bereich der Mutationsfrequenzen, die für Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen beschrieben worden sind (Goossens et al., 1998; Klein et al., 1998). Sowohl der Anteil mutierter Zellen als auch die durchschnittlichen Mutationsfrequenzen unterschieden sich zwischen den untersuchten Subpopulationen EBV-infizierter Zellen nur geringfügig (Tabelle 5). Schwankungen resultieren wahrscheinlich aus der geringen Anzahl der V-Genumlagerungen, die bei einzelnen Subpopulationen (insbesondere V_κ -Genumlagerungen der $EBER^+$ und $LMP1^+$ Zellen) erhalten wurden.

Im zweiten Fall wurden 367 EBV-infizierte Zellen ($EBER^+$, $EBNA2^+$ und HRS-ähnliche Zellen) auf V_H - und V_κ -Genumlagerungen analysiert (Tabelle 4). Aus 67 dieser Zellen wurden 79 umgelagerte V-Gene erhalten. 15% der Zellen zeichneten sich durch unmutierte und 85% der Zellen durch mutierte V-Genumlagerungen aus (Tabelle 5). Die durchschnittliche Mutationsfrequenz mutierter V-Genumlagerungen betrug 6,1% für V_H -Gene und 2,6% für V_κ -Gene. In diesem Fall zeigten die Werte der Mutationsfrequenzen sowie des Anteil mutierter B-Zellen nur geringfügige Schwankungen zwischen den untersuchten Subpopulationen EBV-infizierter Zellen (Tabelle 5).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, daß EBV-infizierte Zellen - unabhängig von der Expression der untersuchten EBV-kodierten Gene und der Morphologie - in zwei distinkte Gruppen unterteilen werden können: 1) Wenige EBV-positive Zellen besitzen unmutierte V-Genumlagerungen und sind demzufolge naive und/oder Keimzentrums-Gründer-B-Zellen; 2) die meisten infizierten Zellen besitzen mutierte Ig-Gene und sind Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen.

Tabelle 5. Sequenzanalyse der V-Genumlagerungen - Mutationsuntersuchung

Fall, Zelltyp	Anzahl informativer Zellen ^a	Prozent der Zellen mit mutierten V-Genen [%]	durchschnittliche Mutationsfrequenz [%] ^b	
			V _H	V _λ
<u>Fall 1</u>				
EBER ⁺	64	97	7,9	6,0 ^c
LMP1 ⁺	33	91	5,5	5,4 ^c
EBNA2 ⁺	19	100	4,8	
HRS-ähnl. Zellen	87	95	5,7	3,2
alle	203	96	6,3	3,9
<u>Fall 2</u>				
EBER ⁺	26	81	5,2	2,2
EBNA2 ⁺	13	92	5,7	
HRS-ähnl. Zellen	28	85	6,8	3,1
alle	67	85	6,1	2,6

^aZellen, von denen mindestens eine V-Genumlagerung erhalten wurde. ^bNur mutierte V-Genumlagerungen wurden berücksichtigt. ^cDie Abweichung von den Werten der anderen Subpopulationen resultiert wahrscheinlich aus der geringen Anzahl der aus diesen Populationen erhaltenen V-Gene (jeweils sechs V_λ-Genumlagerungen).

Das Verhältnis von Aminosäureaustausch- (R) zu stillen (S) Mutationen (R/S-Wert) der FRs kann als Merkmal für die Selektion der B-Zellen auf die Ausprägung eines funktionellen Antikörpers betrachtet werden (Shlomchik et al., 1987). Der intrinsische R/S-Wert der FRs für zufällige, nicht selektionierte Mutationen (wie zum Beispiel in nicht-funktionellen V-Genumlagerungen) nimmt gewöhnlich einen Wert von drei an (Klein et al., 1998). Um die Struktur der Immunoglobuline zu erhalten, werden R-Mutationen in den FRs funktioneller V-Genumlagerungen während der Selektion im Keimzentrum in der Regel gegenselektioniert. Infolgedessen sind selektionierte, funktionelle V-Genumlagerungen im Vergleich zu nicht selektionierten Umlagerungen

durch kleinere R/S-Werte der FRs charakterisiert: der durchschnittliche R/S Wert der FRs für Zentroblasten des Keimzentrums beträgt 1,8 und der Wert für Gedächtnis-B-Zellen liegt gewöhnlich zwischen 1,0 und 1,6 (Klein et al., 1998). Für die hier untersuchten Zellen betrug der durchschnittliche R/S-Wert der FRs funktioneller Ig-Genumlagerungen 1,7; die untersuchten Subpopulationen EBV-infizierter Zellen wiesen dabei nur geringfügige Schwankungen auf. Somit liegt der R/S-Wert EBV-infizierter B-Zellen zwischen dem R/S-Wert für Gedächtnis-B-Zellen und dem für Zentroblasten des Keimzentrums.

3.1.5 Klonale Expansion EBV-infizierter Zellen

Da V-Genumlagerungen klonale Marker der B-Zellen darstellen, ermöglicht der Vergleich der von EBV-infizierten B-Zellen erhaltenen V-Gensequenzen, klonal verwandte EBV-positive B-Zellen zu identifizieren. Auf diese Weise kann die Ausbreitung des Virus durch Proliferation infizierter B-Zellen untersucht werden.

Im ersten Fall konnten 78% der informativen Zellen insgesamt 20 Klonen zugeordnet werden (Tabelle 6). Diese Klone, die zwischen zwei und 45 Mitgliedern besaßen, sind durch folgende Merkmale gekennzeichnet: i) Die Mitglieder einzelner Klone waren nur innerhalb jeweils einer der vier Regionen EBV-infizierter Zellen zu finden (Abbildung 6A). ii) Alle klonal verwandten Zellen besaßen mutierte V-Genumlagerungen (Tabelle 6). Die durchschnittliche Mutationsfrequenz mutierter V_H - und V_κ -Genumlagerungen betrug 7,2% bzw. 4,6%. Diese Werte sind vergleichbar mit der Gesamtpopulation EBV-infizierter Zellen. iii) V-Genumlagerungen klonal verwandter Zellen zeigten keine intraklonale Diversität (Tabelle 6). Nur bei zwei Klonen wurde jeweils ein Mitglied mit einem Unterschied in der Sequenz der V-Genumlagerung im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der jeweiligen Klone gefunden. Insgesamt wurden also lediglich zwei Unterschiede unter etwa 40.000 bp von 172 V-Genumlagerungen festgestellt. Diese Sequenzunterschiede sind möglicherweise auf Fehler der Taq DNA-Polymerase oder seltene spontane Mutationen zurückzuführen.

Im zweiten Fall konnten 32% der informativen Zellen zu acht Klonen

zusammengefaßt werden, die 2-6 Mitglieder besaßen (Tabelle 6). Obwohl EBV-infizierte Zellen in diesem Fall über den gesamten Schnitt verteilt waren, wurde wie im ersten Fall eine regionale Häufung klonal verwandter Zellen beobachtet (Abbildung 6B). Alle acht identifizierten Klone waren durch mutierte V-Genumlagerungen charakterisiert (Tabelle 6). Einer dieser acht Klone bestand aus zwei Mitgliedern mit zwei bzw. drei Mutationen in der klonalen V_H-Genumlagerung und vier Mitgliedern mit unmutierten V-Genen. Die durchschnittliche Mutationsfrequenz mutierter V_H- und V_κ-Gene betrug 6,3% bzw. 1,5%. Mit Ausnahme des oben beschriebenen Klons, der sowohl Mitglieder mit unmutierten als auch mutierten V-Genen besaß, wurde keine intraklonale V-Gen-Diversität unter klonal verwandten Zellen beobachtet (Tabelle 6).

Tabelle 6. Sequenzanalyse der V-Genumlagerungen - Klonale Expansion

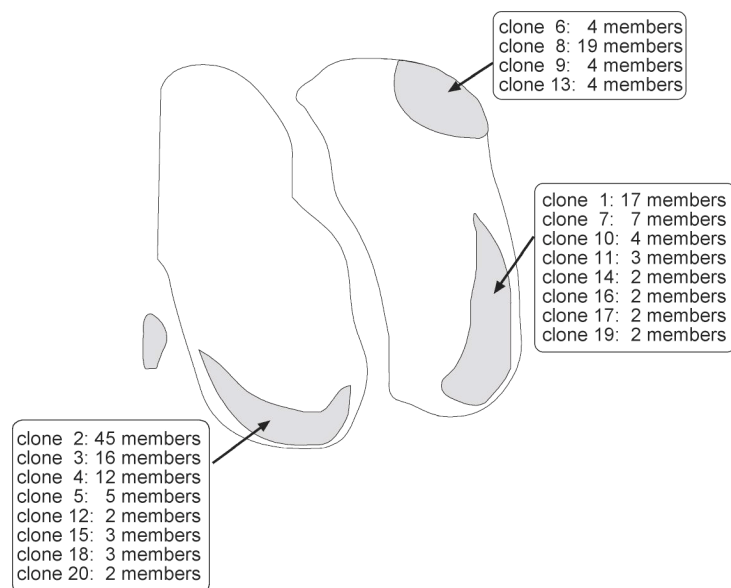
Fall, Zelltyp	Anzahl informativer Zellen ^a	Prozent der Zellen, die zu Klonen gerechnet werden [%]	Anzahl der Klone mit mutierten V-Genen
<u>Fall 1</u>			
EBER ⁺	64	86	
LMP1 ⁺	33	61	
EBNA2 ⁺	19	74	
HRS-ähnl. Zellen	87	79	
alle	203	78	20/20
<u>Fall 2</u>			
EBER ⁺	26	50	
EBNA2 ⁺	13	0 ^b	
HRS-ähnl. Zellen	28	27	
alle	67	32	8/8 ^c

^aZellen, von denen mindestens eine V-Genumlagerung amplifiziert wurde. ^bDie Abweichung dieses Wertes von den Werten der anderen Subpopulationen resultiert vermutlich aus der geringen Anzahl der von EBNA2⁺ Zellen erhaltenen V-Gene. ^cEin „mutierter“ Klon ist durch vier Mitglieder mit unmutierten und zwei Mitgliedern mit mutierten V-Genumlagerungen charakterisiert.

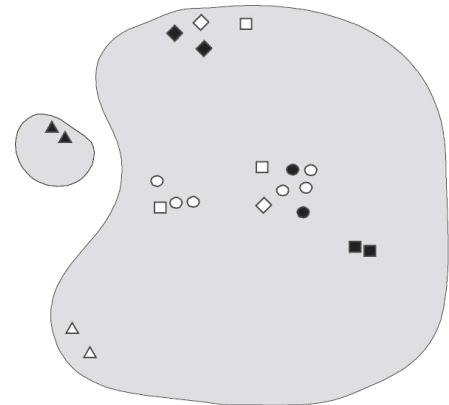
Zusammengefaßt konnte gezeigt werden, daß in beiden untersuchten IM-Fällen eine Vielzahl infizierter B-Zellen Klonen zugeordnet werden konnten. Alle 28 identifizierten Klone waren durch Mitglieder mit mutierten V-Genumlagerungen charakterisiert. Während der Expansion von 27 der 28 Klone wurden keine weiteren somatischen Mutationen in umgelagerte V-Gene eingeführt. Demzufolge stammten diese Klone EBV-infizierter Zellen also entweder von expandierenden Gedächtnis-B-Zellen ab und/oder von proliferierenden Keimzentrums-B-Zellen, die nach der Infektion die somatische Hypermutation einstellten. Nur einer der 28 Klone zeigte intraklonale V-Gen-Diversität: dieser Klon war sowohl durch Mitglieder mit unmutierten als auch mutierten V-Genen charakterisiert. Zusätzlich unterschieden sich die Mitglieder dieses Klons mit mutierten V-Genumlagerungen durch einzelne Punktmutationen. Demnach ist es denkbar, daß dieser Klon von einer Keimzentrums-B-Zelle abstammte, die vor Beginn der somatischen Hypermutation infiziert wurde, und daß nur in einigen Mitgliedern des entstehenden Klons der Prozess der somatischen Hypermutation aktiviert wurde. Die Proliferation infizierter, naiver B-Zellen und die Teilnahme einiger Mitglieder des auf diese Weise gebildeten Klons an der Keimzentrumsreaktion kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Alternativ ist es auch denkbar, daß in diesem Fall jeweils mehrere Mitglieder eines Klones, die sich bereits in einzelnen Mutationen unterschieden, unabhängig voneinander durch EBV infiziert worden sind.

Abbildung 6. Verteilung (klonal verwandter) EBV⁺ Zellen in den untersuchten IM-Fällen

(A)



(B)



Regionen, in denen die überwiegende Mehrzahl EBV-infizierter Zellen zu finden sind, sind grau gefärbt. Die Lokalisation klonal verwandter, EBV⁺ Zellen ist gezeigt. (A) Fall 1: In diesem Fall befanden sich EBV-positive Zellen hauptsächlich in vier distinkten Regionen (grau markiert). Innerhalb dieser einzelnen Regionen waren die Mitglieder einzelner Klone gleichmäßig verteilt. Die Anzahl identifizierter Klone, die Anzahl der Klonmitglieder sowie die Lokalisation der Klone ist angegeben. (B) Fall 2: EBV-infizierte Zellen sind in diesem Fall gleichmäßig über den Schnitt verteilt. Einzelne Mitglieder eines individuellen Klons sind durch die gleichen Symbole gekennzeichnet.

3.1.6 Phänotypische Variation innerhalb EBV-infizierter Klone

In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits deutlich, daß die klonale Expansion nicht auf bestimmte morphologische und phänotypische Subpopulationen EBV-infizierter Zellen beschränkt ist, sondern in sämtlichen untersuchten Subpopulationen infizierter Zellen auftritt (Tabelle 6). Weiterhin zeigte diese Analyse, daß einzelne Klone aus Mitgliedern mit unterschiedlicher Morphologie bestehen können (Tabelle 7). In beiden untersuchten Fällen konnte diese morphologische Varianz insgesamt in acht Klonen beobachtet werden. Zum Beispiel setzte sich Klon 2 des ersten Falls aus 23 kleinen EBV-infizierten Zellen sowie 22 HRS-ähnlichen Zellen zusammen (Tabelle 7). Da - wie in der Literatur beschrieben (Niedobitek et al., 1997) und in Abschnitt 3.1.2 bestätigt -

eine Korrelation zwischen Morphologie und Latenz besteht, legt diese morphologische Variation auch einen Wechsel der Latenzform während der Proliferation nahe.

Tabelle 7. Morphologische Varianz

Fall, Klon	Anzahl der klonal verwandten Zellen	
	kleine Zellen	HRS-ähnliche Zellen
<u>Fall 1</u>		
Klon 2	23	22
Klon 3	5	11
Klon 4	1	11
Klon 5	3	2
Klon 7	6	1
Klon 20	1	1
<u>Fall 2</u>		
Klon 1	4	1
Klon 3	1	2

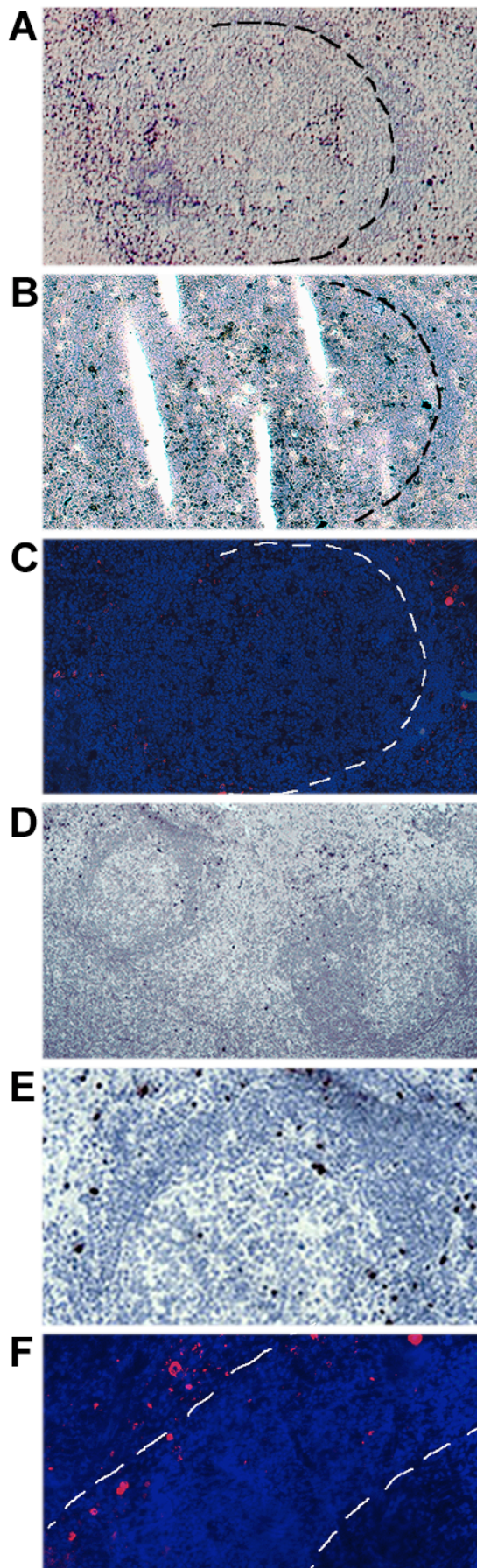
3.2 Untersuchung EBV-infizierter Zellen des Keimzentrums

Die Bedeutung der Keimzentrumspassage infizierter, naiver B-Zellen für die Etablierung des Virus in Gedächtnis-B-Zellen wird kontrovers diskutiert (Abschnitt 1.5). Aus diesem Grunde wurde im zweiten Teil dieser Arbeit in Tonsillen von IM-Patienten nach EBV-infizierten Zellen gesucht, die sich im Keimzentrum befanden. Anschließend wurde das Expressionsmuster EBV-kodierter Gene für diese infizierten Zellen des Keimzentrums bestimmt und die Ig-Genumlagerungen dieser Zellen charakterisiert. Auf diese Weise kann die Abstammung EBV-infizierter Zellen der Keimzentrum sowie die klonale Expansion dieser Zellen untersucht werden.

3.2.1 Histologische Verteilung EBV-infizierter Zellen während der IM

Auf seriellen Schnitten von 20 tonsillären Gewebeproben, die von sieben IM-Patienten stammten, wurden EBER in-situ Hybridisierungen durchgeführt, um EBV-infizierte Zellen in Keimzentren zu identifizieren. Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wurden auch in dieser Serie von Schnitten die meisten EBV-infizierten Zellen in den IFRs gefunden. Obwohl in jedem Fall einige wenige Keimzentren identifiziert werden konnten und selten einzelne EBV-infizierte Zellen in diesen Keimzentren gefunden wurden, wurden nur in zwei Fällen einige (>7) EBER⁺ Zellen in Keimzentren nachgewiesen. In einem Fall (Patient 3) wurde eine Vielzahl EBV-infizierter Zellen (>100 pro Schnitt) sowohl innerhalb als auch außerhalb eines Keimzentrums (GC1) gefunden (Abbildung 7A). Die Struktur der Mantelzone dieses Keimzentrums war teilweise aufgelöst. Im anderen Fall (Patient 4) wurden wenige EBV-infizierte Zellen in zwei benachbarten Keimzentren (10-20 EBV⁺ Zellen pro Schnitt in GC2 und GC3) und der umgebenden IFR nachgewiesen (Abbildung 7D + E). EBV-infizierte Zellen in Tonsillen von IM-Patienten befinden sich also hauptsächlich in der IFR und nur sehr selten in Keimzentren.

Abbildung 7. Phänotypische Charakterisierung EBV-infizierter Zellen im Keimzentrum



(A) – (C) Schnitte des Falls 3, die für die Expression der EBER-Transkripte (A, dunkel-violette Färbung), des EBNA2-Proteins (B, bräunliche Färbung) bzw. des LMP1-Proteins (C, rote Fluoreszenzfärbung) gefärbt sind. Die Grenze des GC1 zu der Mantelzone ist dort durch Striche markiert, wo sie eindeutig zu identifizieren ist.

(D) + (E) Schnitt des Falls 4, der für die Ausprägung der EBER-Transkripte gefärbt ist (dunkel-violette Färbung). Etwa 10 EBER⁺ Zellen befinden sich in GC2 und GC3 (linkes bzw. rechtes Keimzentrum).

(E) Ausschnittsvergrößerung des GC2.

(F) Schnitt des Falls 4, der für LMP1-Expression gefärbt ist (rote Fluoreszenzfärbung). Die inter-follikuläre Lokalisation LMP1⁺ Zellen wird gezeigt. Die Grenze von GC3 und der Mantelzone sind durch Striche markiert. Ein Teil des GC3 ist in der unteren rechten Ecke zu sehen.

Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalun (A, B, D, E) oder Hoechstfarbstoff 33258 (C, F).

Die Abbildungen wurden mit unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommen.

3.2.2 Immunhistochemische Analyse EBV-infizierter Zellen

Die Expression der EBV-kodierten Proteine LMP1 bzw. EBNA2 wurde in den beiden oben beschriebenen IM-Fällen untersucht, in denen EBV-infizierte Zellen in Keimzentren gefunden wurden. Bei diesen Färbungen wurden LMP1-exprimierende Zellen in den IFRs nicht aber in den drei Keimzentren mit EBV-infizierten Zellen nachgewiesen. In den Keimzentren der beiden Fälle wurden nur wenige schwache LMP1-Signale detektiert (Abbildung 7C und F). Daher exprimieren höchstens einige wenige infizierte Zellen pro Keimzentrum LMP1. In Relation zur Anzahl EBER⁺ Zellen auf angrenzenden Schnitten wird EBNA2 von nahezu allen infizierten Zellen in den Keimzentren und von der Mehrheit der Zellen in der IFR ausgeprägt (Abbildung 7B). Folglich exprimieren während der IM EBV-infizierte Zellen außerhalb der Keimzentren LMP1 und/oder EBNA2 und nahezu alle EBV-positiven Zellen innerhalb der Keimzentren EBNA2 aber kein LMP1. Wie in Abschnitt 3.1.2 diskutiert wurde, kann aufgrund der LMP1- und EBNA2-Färbungen nicht ausgeschlossen werden, daß unter den infizierten Zellen wenige LMP1⁻, EBNA2⁻ Zellen in Latenz 0 oder I vorliegen. Deweiteren ist der Nachweis von Latenzen nicht möglich, die nicht wie die beschriebenen, klassischen Latenzformen durch die Expression von LMP1 und EBNA2 sondern durch die Ausprägung anderer viraler Gene definiert werden. Die Spezifität der Färbungen wurde, wie im Abschnitt 3.1.2 beschrieben, nachgewiesen. Für Fall 4 konnte die LMP1-spezifische Färbung wiederholt werden; dabei wurde die oben beschriebene Verteilung LMP1-positiver Zellen bestätigt. Die EBNA2-spezifischen Färbungen der beiden Fälle sowie die LMP1-spezifische Färbung von Fall 3 konnten nicht mehrfach durchgeführt werden, da nur wenige Schnitte mit EBV-infizierten Zellen in Keimzentren vorhanden waren.

3.2.3 PCR-Analyse einzelner mikromanipulierter EBV-infizierter Zellen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der PCR-Analyse einzelner EBV-infizierter Zellen beschrieben, die sich innerhalb der Keimzentren von IM-Tonsillen befanden. Neben der Charakterisierung des Entwicklungsstandes und der klonalen Zusammensetzung der

Population EBV-infizierter Zellen, die sich in Keimzentren befanden, sollte auch die mögliche Verwandtschaft EBV⁺ Zellen im Keimzentrum und EBV⁺ Zellen in der IFR analysiert werden. Hierzu wurde die Ausprägung der EBER-Transkripte für Schnitte beider IM-Fälle nachgewiesen und einzelne EBER⁺ Zellen des GC1, GC2 und GC3 sowie der IFRs mittels Mikromanipulation isoliert. Mittels Einzelzell-PCR wurden diese Zellen auf Ig-Genumlagerungen analysiert (Tabelle 8). In beiden Fällen wurden zusätzlich Gruppen von 3-5 EBER-negativen Zellen analysiert, um die Funktionalität dieser Keimzentren zu bestätigen. In Fall 4 wurden außerdem Gruppen von 3-5 EBER-negativen Zellen der Mantelzone untersucht (Tabelle 8).

Um die Mitglieder der seltenen Population EBV-infizierter Zellen im Keimzentrum in Bezug auf ihre V-Genumlagerungen möglichst vollständig zu charakterisieren, wurden in diesem Teil der Arbeit neben V_H- und V_κ-Genumlagerungen auch V_κ-Gene untersucht. Da nicht-funktionelle V_κ-Genumlagerungen oft unmutierte sind (Abschnitt 3.1.3.3), wurden diese jedoch von der Mutationsanalyse ausgeschlossen. Neben der Untersuchung der V-Genumlagerungen wurden alle informativen Zellen mit Hilfe einer EBV-spezifischen PCR analysiert (Fall 3: EBNA1-spezifische PCR; Fall 4: LF2-spezifische PCR). Auf diese Weise wurde die Infektion der isolierten EBER-positiven Zellen bestätigt und die Kontamination der Proben EBER-negativer Zellgruppen mit EBV-infizierten Zellen für die überwiegende Mehrzahl der Proben ausgeschlossen (Tabelle 8). Für EBER⁺ Zellen von Fall 4 wurde die V-Gen-Analyse nur dann durchgeführt, wenn für diese Zellen ein Produkt in der EBV-spezifischen PCR erhalten worden war.

Wie im ersten Teil dieser Arbeit (Abschnitt 3.1.3.3) wurden auch hier folgende Negativkontrollen untersucht: Aliquots des vorgelegten Puffers, in den die isolierten Zellen überführt wurden, Wasserkontrollen der ersten und zweiten Runde der PCR, Pufferkontrollen (Puffer, der während der Mikromanipulation die Schnitte bedeckte) und im Fall 3 zusätzlich einzelne CD3⁺ T-Zellen, die aus angrenzenden Gefrierschnitten isoliert wurden. Da einige wenige PCR-Produkte aus den CD3⁺ T-Zellen, nicht jedoch

aus den anderen Negativkontrollen dieses Falls wie z. B. den isolierten EBER⁻ Zellen erhalten wurden, liegt wahrscheinlich zelluläre Kontamination während der Mikromanipulation der T-Zellen vor. Diese zelluläre Kontamination könnte durch technische Probleme begründet sein wie z.B. Verwendung von Gewebeschnitten, die dicker als eine Zellschicht waren. Trotz dieser Kontamination wird die Verlässlichkeit des Versuches durch folgende Argumente bekräftigt: i) PCR-Produkte wurden mit einer höheren Effizienz aus EBER⁺ Zellen (30-43%) als aus "T-Zellen" (11%) erhalten, ii) aus Kontrollen vorgelegtem Puffers und Pufferkontrollen wurden keine PCR-Produkte erhalten, iii) die sehr geringe Frequenz der EBV-PCR Produkte, welche von EBER⁻ Proben erhalten wurden (2%) und iv) die Tatsache, daß alle EBER⁺ Zellen des ersten Falls, von denen Ig-Gene amplifiziert werden konnten, auch positiv in der EBV-spezifischen PCR waren.

Aus Positivkontrollen - einzelne Zellen lymphoblastoider Zelllinien mit bekannten V-Genumlagerungen (Daten nicht gezeigt) sowie in Fall 3 einzelne CD20-positive B-Zellen angrenzender Schnitte wurde eine Reihe unterschiedlicher V-Genumlagerungen amplifiziert (Tabelle 8). Demzufolge sind die verwendeten PCRs in der Lage, die unterschiedlichen Ig-Gene einzelner Zellen zu vervielfältigen.

Tabelle 8. PCR-Analyse einzelner Zellen, die sich in Keimzentren bzw. der IFR befanden

Fall	Zelltyp, Lokalisation	Anzahl analysierter Zellen/Proben ^a	Anzahl EBV-PCR- positiver Proben ^b	Anzahl der V-Genumlagerungen		
				V _H	V _κ	V _λ
EBER⁺						
<u>Fall 3</u>	GC1	47	30	16	1	
	IFR ^c	68	47	18		
<u>Fall 4</u>	GC2	32	11	4	4	4
	GC3	28	17	7	11	5
	IFR ^c	180	114	59	40	34
EBER⁻						
<u>Fall 3</u>	GC1	45	0	13	16	11
<u>Fall 4</u>	GC2	38	0	19	12	9
	GC3	40	3	9	11	5
	Mantelzone von GC2	22	0	14	12	12
	Mantelzone von GC3	16	0	8	10	7
Kontrollen						
<u>Fall 3 + 4</u>						
	B-Zellen ^d	23	11	7	6	7
	T-Zellen ^d	36	4 ^e	4 ^e	1	1 ^e
	Pufferkontrollen	100	0	0	0	0

^a3-5 EBER-negative Zellen pro Reaktionsgefäß, angegeben ist die Zahl der Proben. ^bProben des Falls 3 wurden mit Hilfe der EBNA1-PCR und Proben des Falls 4 mit Hilfe der LF2-PCR untersucht. ^cEinige dieser Zellen, die sich am Übergang der Keimzentren zur Mantelzone befanden, werden als interfollikuläre Zellen gewertet, um eine fehlerhafte Zuordnung dieser Zellen zu den Keimzentren zu vermeiden. ^dCD20⁺ B-Zellen und CD3⁺ T-Zellen wurden aus Schnitten isoliert, die an die für EBER-Expression gefärbten Schnitte angrenzen. ^eNeben Produkten der EBV-spezifischen PCR wurde aus zwei T-Zellen V_H- und V_κ-Genumlagerungen erhalten. Diese Proben waren daher wahrscheinlich mit EBV-infizierten B-Zellen kontaminiert.

3.2.4 EBV-negative B-Zellen in Keimzentren nehmen an der Keimzentrumsreaktion teil

Aus jeweils etwa 40 Gruppen EBV-negativer Keimzentrums-Zellen des GC1, GC2 und GC3 wurden 40, 40 bzw. 25 V-Genumlagerungen amplifiziert. 66% dieser V-Gene aus GC1, 91% der V-Gene aus GC2 und 42% der V-Gene GC3 sind durch somatische Mutationen charakterisiert (Tabelle 9). Da im Verlauf der Keimzentrumsreaktion der Anteil der Keimzentrums-B-Zellen mit mutierten V-Genen zunimmt (Weiss et al., 1992), deutet die hohe Frequenz von B-Zellen mit mutierten V-Genumlagerungen in GC1 und GC2 auf das fortgeschrittene Entwicklungsstadium dieser Keimzentren hin. Im Gegensatz dazu stellt GC3 aufgrund der geringen Frequenz von B-Zellen mit mutierten V-Genumlagerungen vermutlich eine frühere Phase der Keimzentrums-Entwicklung dar. In GC1 wurden drei Klone EBV-negativer B-Zellen mit jeweils zwei Mitgliedern und in GC2 sechs Klone mit zwei bis fünf Mitgliedern identifiziert (Tabelle 9). Intraklonale Diversität wurde in acht dieser neun in GC1 und GC2 gefundenen Klone festgestellt (Tabelle 9). In GC3 konnten - mit Ausnahme einer Zelle, die mit einer Zelle des GC2 verwandt war - keine klonal verwandten Zellen identifiziert werden. Zellen der Mantelzone von GC2 und GC3 besaßen in der überwiegenden Mehrheit unmutierte V-Genumlagerungen (Tabelle 9).

Zusammengefaßt zeigt diese Analyse, daß in GC1 und GC2 EBV-negative B-Zellen durch fortschreitende somatische Hypermutationsaktivität charakterisiert sind. Demzufolge handelt es sich bei diesen untersuchten, histologischen Strukturen um Keimzentren. Obwohl in GC3 keine expandierenden Keimzentrums-B-Zellklone identifiziert wurden, zeigt auch GC3 typische Merkmale von Keimzentren: So ist GC3 von einer Mantelzone naiver B-Zellen umgeben. Außerdem exprimiert die Mehrheit der Zellen in GC3 das Keimzentrums-spezifischen Proteins Bcl-6 (ohne Abbildung). Die geringe Frequenz der Zellen mit mutierten V-Genumlagerungen sowie die niedrige Frequenz klonal verwandter Zellen deuten darauf hin, daß sich GC3 in einer frühen Entwicklungsphase befindet (Küppers et al., 1993; Weiss et al., 1992).

Tabelle 9. Sequenzanalyse der V-Genumlagerungen – Klonale Expansion

Fall, Lokalisation der Zellen	Anzahl positiver Proben ^a	Prozent der Zellen mit mutierten V-Genen ^{a, b} [%]	Prozent der klonalen V-Gene ^a [%]	Klone mit mutierten V- Genen/ Gesamtanzahl der Klone	Intraklonale Diversität
<u>EBER⁺</u>					
<u>Fall 3</u>					
GC1	16	100	94	1/1	
IFR	18	100	100	1/1	
alle	34	100	97	1/1 ^c	nein
<u>Fall 4</u>					
GC2	6	84	67	3/3	
GC3	15	100	73	6/6	
IFR	83	95	64	15/15	
alle	104	95	65 ^d	17/17 ^c	nein
<u>EBER⁻</u>					
<u>Fall 3</u>					
GC1	40	66	20	3/3	ja
<u>Fall 4</u>					
GC2	40	91	50 ^d	6/6 ^e	ja
GC3	25	42	4	0/1 ^e	?
Mantelzone von GC2	38	10	0	0/0	
Mantelzone von GC3	25	0	8	0/1	nein

^aFür EBER⁺ Zellen ist die Anzahl positiver Zellen angegeben. Da Gruppen EBER⁻ Zellen isoliert worden sind, beziehen sich die Angaben für EBER⁻ Zellen auf V-Genumlagerungen. ^bNicht-funktionelle V_H-Genumlagerungen wurden nicht berücksichtigt, da sie gewöhnlich inaktiviert sind und nicht an der somatischen Hypermutation teilnehmen. ^cMitglieder einzelner Klone befinden sich innerhalb und außerhalb der Keimzentren. ^dVier Mitglieder zweier Klone zeigten zusätzliche V-Genumlagerungen, die nicht mit den Umlagerungen anderer Klonmitglieder kompatibel sind und ein geringes Maß zellulärer Kontamination anzeigen. Diese Umlagerungen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. ^eDer Klon besteht aus einem Mitglied aus GC2 und einem Mitglied aus GC3; nur eines dieser Mitglieder ist durch eine mutierte V-Genumlagerung gekennzeichnet.

3.2.5 EBV-infizierte B-Zellen in Keimzentren nehmen nicht an der Keimzentrumsreaktion teil

In Fall 3 wurden V_H -Genumlagerungen von 16 bzw. 18 EBV-infizierten Zellen aus GC1 und der IFR amplifiziert (Tabelle 8). Von einer der Zellen in GC1 wurde zusätzlich eine V_κ -Genumlagerung erhalten. Mit Ausnahme einer Zelle können alle anderen 33 Zellen (97% der informativen Zellen) einem einzigen Klon zugeordnet werden; es lag demzufolge massive klonale Expansion vor (Tabelle 9). Dieser Klon ist durch ein mutiertes V_H3 -Rearrangement charakterisiert (Mutationsfrequenz 9,8%). Intraklonale V-Gen-Diversität wurde in keiner der 33 klonal verwandten Zellen gefunden (Tabelle 9).

In Fall 4 wurden 70 V_H - 55 V_κ - und 43 V_λ -Genumlagerungen von 240 EBV-infizierten Zellen aus GC2 und GC3 sowie der IFR erhalten. 67%, 73% und 63% der informativen EBV-positiven Zellen aus GC2, GC3 und der IFR können Klonen zugeordnet werden (Tabelle 9). Mitglieder dieser Klone sind nicht auf eines der Keimzentren bzw. die IFR beschränkt. Vielmehr sind klonal verwandte Zellen von 6 der 17 identifizierten Klone über die beiden Keimzentren und die IFR verteilt. Während etwa 5% der EBV-infizierten Zellen durch unmutierte V-Genumlagerungen charakterisiert sind, besitzen alle klonal verwandten Zellen mutierte V-Gene (durchschnittliche Mutationsfrequenz mutierter V_H -Gene: 7,8%). Intraklonale V-Gen-Diversität wurde unter den infizierten B-Zellen jedoch nicht beobachtet (Tabelle 9).

Zusammengefaßt wurde in beiden untersuchten Fällen von IM gezeigt, daß EBV-infizierte Zellen der Keimzentren und der umgebenden IFR zu Klonen expandieren. Mitglieder dieser Klone sind über die Keimzentren und die IFR verteilt. Im Gegensatz zu nicht infizierten B-Zellen, die sich in den gleichen Keimzentren befinden, werden während der Proliferation EBV-positiver Zellen keine somatischen Mutationen in umgelagerte V-Gene eingeführt – EBV-infizierte Zellen nehmen also nicht an der Keimzentrumsreaktion teil.

3.3 Vergleich von EBV-infizierten Zellen mit Tumorzellen EBV-assoziierter B-Zell-Lymphome

Eine Assoziation mit EBV wurde für eine Reihe von B-Zell-Lymphomen - wie dem BL, dem PTLD und dem MH - beschrieben (siehe Abschnitt 1.6). Diese Lymphome stammen vermutlich von bereits infizierten Tumovorläuferzellen ab, da monoklonale EBV-Genome in den Tumorzellklonen nachgewiesen werden konnten (Abschnitt 1.6). Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob diese infizierten Tumovorläuferzellen unter EBV-positiven B-Zellen der IM gebildet werden. Das Expressionsmuster EBV-kodierter Gene sowie das Muster der somatischen Mutationen dienten dabei als Merkmal, um Zellen mit Charakteristika der möglichen Tumovorläuferzellen zu identifizieren. Zunächst wurden aufgrund phänotypischer Übereinstimmungen (Abschnitt 1.5) HRS-ähnliche Zellen der IM mit HRS-Zellen des MH und im Weiteren EBV-assozierte B-Zell-Lymphome, die vermutlich von Keimzentrums-B-Zellen abstammen (BL, PTLD und MH) (Küppers et al., 1999), mit EBV-positiven B-Zellen der Keimzentren verglichen.

3.3.1 Vergleich von HRS-ähnlichen Zellen der IM mit HRS-Zellen des MH

Die Analyse der V-Genumlagerungen einzelner HRS-Zellen zeigte, daß die Mehrzahl der MH-Fälle von B-Zellen abstammen (Bräuninger et al., 1999a; Irsch et al., 1998; Kanzler et al., 1996a; Kanzler et al., 1996b; Küppers et al., 1994; Küppers et al., 2001; Marafioti et al., 1999; Marafioti et al., 2000; Müschen et al., 2001; Müschen et al., 2000; Spieker et al., 2000; Vockerodt et al., 1998). In diesen Fällen bilden die HRS-Zellen eine klonale Population reifer B-Zellen, die in der überwiegenden Mehrheit (98%) durch mutierte V-Genumlagerungen gekennzeichnet sind (durchschnittliche Mutationsfrequenz der V_H-Genumlagerungen: 11,7%; Tabelle 10). Weiterhin zeigten die V-Genumlagerungen der Tumorzellen Hinweise auf eine Abstammung der HRS-Zellen von präapoptotischen Keimzentrums-B-Zellen: Bei etwa 25% der MH-Fälle wurden in potentiell-funktionell umgelagerten V-Genen destruktive Mutationen gefunden, die z.B.

durch Bildung von Stopcodons zum Verlust der Funktionalität der V-Genumlagerungen führten (Tabelle 10); solche B-Zellen ohne funktionellen B-Zellrezeptor sollten normalerweise im Keimzentrum durch Apoptose eliminiert werden (Lam et al., 1997; Weiss and Rajewsky, 1990). Auch der durchschnittliche R/S-Wert der FRs der HRS Zellen (1,7) steht im Einklang mit der Herleitung dieser Zellen von Keimzentrums-B-Zellen (Tabelle 10).

Die überwiegende Mehrheit der hier untersuchten HRS-ähnlichen Zellen der Fälle 1 und 2 befinden sich wie die HRS-Zellen des MH in Latenz II, nur wenige HRS-ähnliche Zellen sind in Latenz III (Tabelle 10). Während die HRS-ähnlichen Zellen im Vergleich zu den HRS-Zellen einen ähnlichen durchschnittlichen R/S-Wert der FRs (1,6) besaßen, war die durchschnittliche Mutationsfrequenz der HRS-ähnlichen Zellen (6,9%) niedriger als die der HRS-Zellen des MH (Tabelle 10). Im Gegensatz zu den HRS-Zellen wurden die HRS-ähnlichen Zellen durch folgende Merkmale gekennzeichnet: i) HRS-ähnliche Zellen eines IM-Falls bilden nicht einen einzelnen Klon; sie können vielmehr mehreren Klonen zugeordnet werden, ii) etwa 14% der HRS-ähnlichen Zellen besitzen unmutierte V-Genumlagerungen und iii) unter nahezu 50 HRS-ähnlichen Zellen, von denen mindestens eine mutierte, potentiell-funktionelle V-Genumlagerung amplifiziert wurde, wurde keine destruktive Mutation gefunden (Tabelle 10).

Tabelle 10. Vergleich der HRS-Zellen des MH mit HRS-ähnlichen Zellen der IM

Merkmal	HRS-Zellen ^a	HRS-ähnliche Zellen ^a
Frequenz mutierter Fälle bzw. Zellen ^b	98% (46/47)	86% (55/64)
durchschnittliche Mutationsfrequenz ^{b, c}	11,7%	6,9%
Frequenz der Fälle bzw. Zellen mit destruktiven Mutationen ^d	27% (7/26)	0%
R/S Wert der FRs ^d	1,7	1,6
Latenzform EBV-kodierter Gene	II	II und selten III

^aKlonal verwandte Zellen werden nur einmal betrachtet. ^bBei der IM werden diese Angaben auf die einzelnen HRS-ähnlichen Zellen und bei den MH-Fällen auf die Tumorzellklone der Fälle bezogen, die in folgenden Veröffentlichung beschrieben wurden: (Bräuninger et al., 1999a; Irsch et al., 1998; Kanzler et al., 1996a; Kanzler et al., 1996b; Küppers et al., 1994; Küppers et al., 2001; Marafioti et al., 1999; Marafioti et al., 2000; Müschen et al., 2001; Müschen et al., 2000; Spieker et al., 2000; Vockerodt et al., 1998). ^cBezogen auf mutierte V_H-Genumlagerungen. ^dBei der IM werden diese Angaben auf die einzelnen HRS-ähnlichen Zellen und bei den MH-Fällen auf die Tumorzellklone der Fälle bezogen, die in folgenden Veröffentlichung beschrieben wurden: (Bräuninger et al., 1999a; Irsch et al., 1998; Kanzler et al., 1996a; Kanzler et al., 1996b; Küppers et al., 1994; Küppers et al., 2001; Muramatsu et al., 2000; Müschen et al., 2001; Spieker et al., 2000; Vockerodt et al., 1998).

3.3.2 Vergleich EBV-infizierter B-Zellen in Keimzentren der IM mit EBV-assoziierten Lymphomen, die vom Keimzentrums-B-Zellen abstammen

Die Tumorzellklone des BL, die Latenz I zeigen, sind oft durch Merkmale fortschreitender somatischer Hypermutation charakterisiert (Tabelle 11) (Chapman et al., 1995). Auch Tumorzellen einiger PTLD-Fälle zeigen intraklonale V-Gen-Diversität (persönliche Mitteilung Andreas Bräuninger). Diese fortschreitende somatische Hypermutation des Tumorklons wird aber nur in Fällen beobachtet, die nicht durch Latenzform III, sondern durch eingeschränktere virale Genexpression gekennzeichnet sind (Tabelle 11). Schließlich sind die Tumorzellen EBV-positiver MH-Fälle, welche die Latenzform II zeigen, wie oben beschrieben oft durch destruktive Mutationen gekennzeichnet (Tabelle 11). Diese destruktiven Mutationen wurden auch bei einigen PTLD-Fällen gefunden (persönliche Mitteilung Andreas Bräuninger).

Tabelle 11. Vergleich von EBV⁺ B-Zellen in Keimzentren der IM mit EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen, die vermutlich von Keimzentrums-B-Zellen abstammen

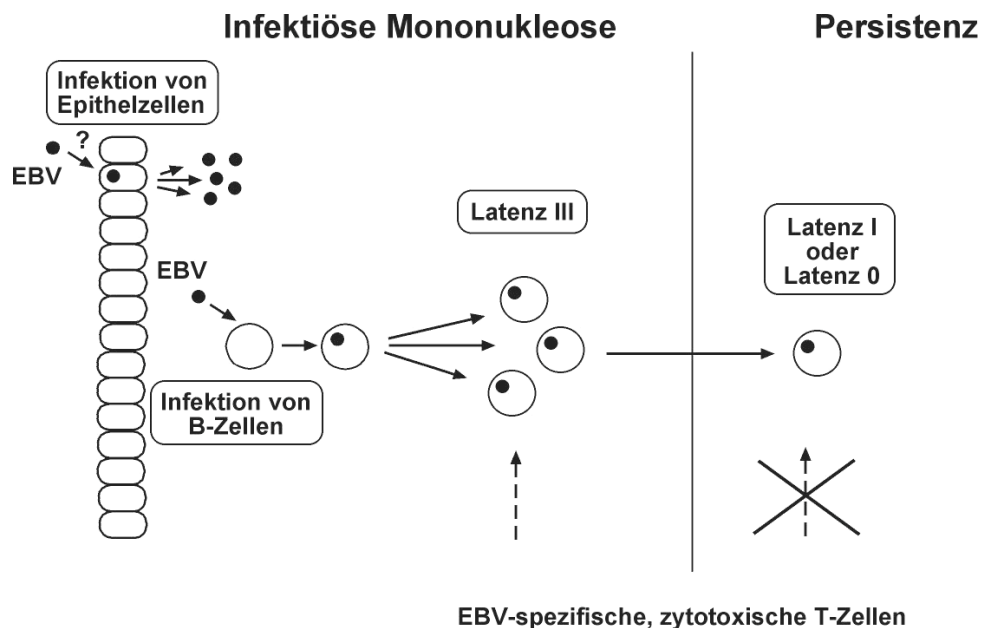
	Mutationsmuster		Latenzform			
	intraklonale Diversität	destruktive Mutationen	I	II	III	V
IM: EBV ⁺ B-Zellen der Keimzentren	-	-				+
BL ^a	+	-	+			
PTLD ^b	+/-	-/+		+	+	
MH ^c	-	+		+		

^aBeschrieben von Chapman et al. (Chapman et al., 1995). ^b Jeweils in 2 von 5 PTLD-Fällen wurden destruktive Mutationen bzw. intraklonale Diversität beschrieben (persönliche Mitteilung Andreas Bräuninger). ^c In 7 von 26 untersuchten MH-Fällen sowie in 2 von 5 PTLD-Fällen wurden destruktive Mutationen beschrieben (Bräuninger et al., 1999a; Irsch et al., 1998; Kanzler et al., 1996a; Kanzler et al., 1996b; Küppers et al., 1994; Küppers et al., 2001; Muramatsu et al., 2000; Müschen et al., 2001; Spieker et al., 2000; Vockerodt et al., 1998).

Vergleicht man diese Merkmale der Tumorzellen mit denen EBV-infizierter B-Zellen der Keimzentren (Fall 3 und Fall 4) so wird deutlich, daß unter EBV⁺ B-Zellen der Keimzentren während der IM keine Zellen die Charakteristika der Tumorzellen bezüglich Mutationsmuster und Latenzform EBV-kodierter Gene besaßen. Weder intraklonale Diversität noch destruktive Mutationen wurde unter 37 informativen EBV⁺ B-Zellen der Keimzentren beschrieben (Tabelle 11). Ebenfalls zeigen EBV-infizierte Zellen der Keimzentren der IM eine andere Latenzform als die Tumorzellen des BL, des PTLD und des MH (Tabelle 11).

4 DISKUSSION

Obwohl seit 1968 bekannt ist, daß es sich bei der Krankheit IM um die symptomatische Primärinfektion mit EBV handelt (Henle et al., 1968), ist wenig über die Ausbreitung des Virus während der IM sowie die Etablierung der lebenslangen Viruspersistenz bekannt. Bisher wurden nur wenige histologische Untersuchungen am tonsillären Gewebe durchgeführt, in denen insbesondere die Lage und Morphologie infizierter Zellen während der IM beschrieben sowie die Abstammung EBV-positiver Zellen von z.B. B- oder T-Zellen untersucht wurde (Anagnostopoulos et al., 1995; Isaacson et al., 1992; Niedobitek et al., 1997; Reynolds et al., 1995; Tokunaga et al., 1993). Auf der Grundlage dieser Analysen sowie durch Übertragung der Ergebnisse von in vitro Studien wurde folgendes Modell zur Ausbreitung von EBV im B-Zellkompartiment während der IM entwickelt (Rickinson and Kieff, 2001): Nach Übertragung des Virus mit dem Speichel werden B-Zellen - entweder unmittelbar oder nach Infektion und Replikation des Virus in Epithelzellen - mit EBV infiziert (Abbildung 8). Infizierte B-Zellen befinden sich während der IM nur selten in Keimzentren und nehmen daher möglicherweise nicht oder nur selten an der Keimzentrumsreaktion teil. Vermutlich zeigt die Mehrzahl infizierter B-Zellen in Analogie zu in vitro infizierten B-Zellen Latenz III. Diese Latenzform hat wahrscheinlich zwei wichtige Auswirkungen auf die Etablierung der Infektion. Einerseits werden in vivo infizierte B-Zellen vermutlich wie in vitro infizierte B-Zellen zur Proliferation getrieben (Abbildung 8). Andererseits entwickelt sich infolge der Expression immunogener Proteine in Latenz III eine EBV-spezifische T-Zellantwort, welche die Mehrheit der infizierten Zellen eliminiert (Abbildung 8). Indem EBV in wenigen infizierten B-Zellen die Latenzform wechselt und in Latenz I oder in Latenz 0 entweder keine oder nur geringfügig immunogene Proteine ausprägt, könnten diese infizierten Zellen der Kontrolle durch das Immunsystem entgehen und das Reservoir des Virus bilden (Abbildung 8).

Abbildung 8. Bisheriges Modell zur Ausbreitung von EBV während der IM

Ovale Symbole: Epithelzellen; schwarze Kreise: EBV; weiße Kreise: B-Zellen.

Während der IM infiziert EBV B-Zellen und wahrscheinlich Epithelzellen. EBV tritt in Epithelzellen vermutlich in die lytische Phase und in B-Zellen in die latente Phase des Infektionszyklus ein. Es wird angenommen, daß infizierte B-Zellen Latenz III zeigen und proliferieren. Nach Wechsel der Latenzform zu Latenz I oder Latenz 0 können infizierte B-Zellen wahrscheinlich der EBV-spezifischen, zytotoxischen T-Zellantwort entgehen und auf diese Weise eine persistente Infektion etablieren.

Das bisherige Modell zur Ausbreitung des Virus im B-Zellkompartiment während der IM basierte hauptsächlich auf Übertragungen der Ergebnisse von Zellkulturstudien auf die Prozesse während der IM. In der vorliegenden Arbeit sollten daher EBV-infizierte B-Zellen aus tonsillärem Gewebe von IM-Patienten direkt untersucht werden, um folgende Fragen zu klären: (i) Welche Latenzform exprimiert EBV während der IM? (ii) Infiziert EBV während der IM B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (naive, Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen)? (iii) Breitet sich EBV durch Proliferation infizierter B-Zellen aus? (iv) Nehmen infizierte B-Zellen während der IM an einer Keimzentrumsreaktion teil? Hierzu wurden tonsilläre Schnitte für die Expression EBV-kodierter Genprodukte gefärbt und einzelne EBV-infizierte Zellen aus dem Gewebeverband isoliert, um V-Genumlagerungen dieser Zellen mittels Einzelzell-PCR zu untersuchen.

4.1 Lokalisation und Latenzformen EBV-infizierter Zellen der IM

In Übereinstimmung mit einer Reihe histologischer Untersuchungen (Anagnostopoulos et al., 1995; Niedobitek et al., 1997) wurden EBV-infizierte Zellen in den hier untersuchten IM-Tonsillen hauptsächlich in der IFR und nur sehr selten in Keimzentren gefunden (Abschnitte 3.1.1 und 3.2.1). Desweiteren bestätigte die vorliegende Arbeit, daß sich die Population EBV-infizierter Zellen - wie bereits von Niedobitek et al. beschrieben (Niedobitek et al., 1997) - aus Zellen in verschiedenen Latenzen zusammensetzt: Neben Zellen in Latenz 0 bzw. I wurden in allen untersuchten Fällen Zellen in Latenz II, III und IV nachgewiesen (Abschnitte 3.1.2 und 3.2.2).

Neben dieser Charakterisierung der während der IM exprimierten Latenzformen wurde in der vorliegenden Arbeit die Frequenz der Zellen in unterschiedlichen Latenzen untersucht. Obwohl die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Latenzformen starke Schwankungen zwischen den hier untersuchten IM-Fällen zeigte, wurde in allen vier Fällen deutlich, daß die Mehrzahl EBV-positiver B-Zellen der IFRs sowie (nahezu) alle EBV-positiven Zellen in den Keimzentren Latenz IV (LMP1⁻, EBNA2⁺) zeigten (Abschnitte 3.1.2 und 3.2.2). Der Nachweise LMP1⁻, EBNA2⁺ Zellen unter Verwendung von zwei unterschiedlichen LMP1-spezifischen Antikörpern spricht für die Spezifität der Färbung. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß die Sensitivität der Färbung zu gering war, um eine schwache LMP1-Expression der Zellen nachzuweisen.

Die fehlende LMP1-Expression EBV-infizierter B-Zellen der Keimzentren steht im Einklang mit den Ergebnissen B-Zell-spezifischer LMP1-transgener Mäuse (Abschnitt 1.4), welche eine Unvereinbarkeit der LMP1-Ausprägung und der Differenzierung zu Keimzentrums-B-Zellen vermuten lassen (Uchida et al., 1999). Auch in vitro Experimente deuten auf eine Inkompatibilität der LMP1-Expression mit der Teilnahme infizierter B-Zellen an der Keimzentrumsreaktion hin: In BL-Zelllinien, die einen Keimzentrumsphänotyp zeigen, wurde durch LMP1-Expression die Ausprägung des Keimzentrums-spezifischen Proteins Bcl-6 blockiert (Cattoretti et al., 1997). Da das Bcl-6 Protein für die Ausbildung der Keimzentren notwendig ist (Abschnitt 1.2; Dent et

al., 1997), können möglicherweise nur Bcl-6-positive Zellen zu Keimzentrums-B-Zellen differenzieren. Demzufolge würden sich LMP1-exprimierende, Bcl-6-negative B-Zellen nicht zu Keimzentrums-B-Zellen entwickeln und in der IFR bleiben. Möglicherweise induziert LMP1 die Herunterregulation der Bcl-6-Expression über Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, ERK-1 und ERK-2 (Roberts and Cooper, 1998). Diese Kinasen phosphorylieren Bcl-6 und bewirken damit die Ubiquitinierung und Degradation des Bcl-6 Proteins (Niu et al., 1998). Die Korrelation zwischen LMP1-Expression und fehlender Bcl-6-Ausprägung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da keine weiteren Schnitte mit EBV-infizierten Zellen in Keimzentren vorhanden waren.

Da nach Infektion von B-Zellen in vitro zuerst EBNA2 und erst ca. 24 Stunden später LMP1 exprimiert wird (Alfieri et al., 1991), diskutierten Niedobitek et al., daß sich LMP1⁻, EBNA2⁺ Zellen wahrscheinlich in einem vorübergehenden Expressionsmuster kurz nach Infektion der Zelle befinden (Niedobitek et al., 1997). Durch die V-Gen Analyse EBV-infizierter Zellen der Keimzentren wurde allerdings deutlich, daß es sich bei dieser Latenzform vermutlich um ein stabiles Expressionsmuster EBV-kodierter Gene handelt: Da EBNA2⁺, LMP1⁻ Zellen der Keimzentren zu großen, expandierten Klonen gehören, ist es unwahrscheinlich, daß die Mehrzahl dieser Zellen neu infiziert ist und ein vorübergehendes Expressionsmuster zeigt. Vielmehr scheint diese Latenzform IV ein stabiles Muster EBV-kodierter Gene zu sein, das bisher nicht beschrieben wurde.

Der Nachweis dieser Population von Zellen, die EBNA2 nicht jedoch LMP1 ausprägen, in den IFRs sowie den Keimzentren der IM-Tonsillen ist überraschend, da EBNA2 die Transkription von LMP1 aktiviert und die EBNA2-Expression in den bekannten Latenzformen immer mit der Ausprägung von LMP1 assoziiert ist (Abschnitt 1.4). Diese Aktivierung der LMP1-Expression erfolgt durch Interaktion von EBNA2 mit weiteren Proteinen wie RBP-J κ und PU-1 (Abschnitt 1.4). Daher ist es möglich, daß die fehlende LMP1-Expression trotz EBNA2-Ausprägung z.B. durch schwache oder

fehlende Ausprägung dieser notwendigen Kofaktoren des EBNA2-Proteins begründet ist. Alternativ ist es auch denkbar, daß in diesen Zellen der LMP1-Promotor z.B. aufgrund von Methylierung nicht aktivierbar ist. Da EBNA2 nicht nur die Ausprägung von LMP1 reguliert, sondern auch die Expression anderer viraler Gene aktiviert (z.B. LMP2A), wäre es von Interesse, die Expression dieser EBNA2-regulierten Gene in Zellen der Latenz IV zu untersuchen.

4.2 EBV-infizierte B-Zellen der IFR

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der V-Gen-Analyse EBV-infizierter Zellen der IFRs - der Hauptpopulation infizierter Zellen - diskutiert, um allgemeine Strategien der Ausbreitung des Virus während der IM aufzuzeigen.

4.2.1 Sowohl naive als auch Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen sind EBV-infiziert

Während seit längerem bekannt ist, daß ein großer Teil - wenn nicht sogar die überwiegende Mehrheit - EBV-infizierter Zellen der IM B-Zellen sind (Anagnostopoulos et al., 1995; Niedobitek et al., 1997; Tokunaga et al., 1993), wurde das Entwicklungsstadium infizierter B-Zellen bisher noch nicht charakterisiert. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten V-Gensequenzanalyse einzelner EBV-positiver Zellen konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, daß einige EBV-infizierte B-Zellen unmutierte V-Genumlagerungen besitzen und folglich entweder naive B-Zellen oder Mitglieder der seltenen Population der Keimzentrums-Gründer-B-Zellen sind (Abschnitt 3.1.4). Die Mehrzahl EBV-positiver Zellen (96 bzw. 85% in den beiden untersuchten Fällen) sind allerdings Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen, die durch mutierte V-Genumlagerungen charakterisiert sind. Diese Abstammung von Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen wird durch den durchschnittlichen R/S-Wert infizierter Zellen unterstützt, der sich zwischen dem erwarteten Wert für Keimzentrums-B-Zellen und dem Wert für Gedächtnis-B-Zellen befindet (Abschnitt 3.1.4).

Die Analyse gibt ferner Aufschluß über eine mögliche Korrelation zwischen Differenzierungsstadium und Morphologie der untersuchten EBV-infizierten Zellen. Da die Morphologie mit der Ausprägung unterschiedlicher Latenzformen korreliert (Abschnitt 3.1.2), kann demzufolge auch das Verhältnis des Differenzierungsstadiums zur Latenzform untersucht werden. Zum einen konnte gezeigt werden, daß B-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien die gleiche Morphologie bzw. Latenzform annehmen können. Zum Beispiel können sowohl naive als auch Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen die Morphologie der HRS-ähnlichen Zellen besitzen und wahrscheinlich die EBV-kodierten Genprodukte der Latenz II ausprägen (Abschnitt 3.1.4). Zum anderen wurde deutlich, daß sich infizierte B-Zellen eines Entwicklungsstadiums in der Morphologie und demzufolge auch in der Latenzform unterscheiden können; so können z.B. naive B-Zellen sowohl kleine B-Zellen in Latenz I, III oder IV als auch HRS-ähnliche Zellen in Latenz II oder selten in Latenz III sein (Abschnitt 3.1.4). Folglich bewirkt also das Differenzierungsstadium infizierter B-Zellen nicht die Morphologie der Zellen. Auch die Latenzform, die in infizierten Zellen ausgeprägt wird, ist nicht abhängig vom Differenzierungsstadium dieser infizierten B-Zellen. Desweiteren sind die unterschiedlichen Morphologien bzw. Latenzformen nicht auf ein spezielles Entwicklungsstadium der Zellen beschränkt. Faktoren, welche die Latenzform bzw. Morphologie der Zellen bestimmen, sind nicht bekannt.

In vitro Experimente lassen jedoch vermuten, auf welche Weise die Morphologie infizierter Zellen durch die Latenzform beeinflusst werden kann: Nach Transfektion des LMP1-Gens sowohl in eine EBV-negative Zelllinie des MH als auch in eine embryonale Nierenzelllinie nimmt ein bedeutender Teil LMP1-positiver Zellen die Morphologie der vielkernigen Reed-Sternberg-Zellen an (Knecht et al., 1996). Diese LMP1 induzierte Entwicklung der HRS-Zell-ähnlichen Morphologie wird wahrscheinlich teilweise über die Regulation der CD99-Expression bewirkt, da LMP1 über Aktivierung von NF κ B die CD99-Ausprägung reprimiert und fehlende CD99-Expression eine HRS-Zell-ähnliche Morphologie in B-Zelllinien induziert (Kim et al., 1998; Kim et al., 2000; Lee et al., 2001).

Es müssen allerdings weitere Faktoren an der Entwicklung der HRS-Zell-ähnlichen Morphologie beteiligt sein, da die Mehrzahl LMP1-ausprägender Zellen in Latenz III nicht den Phänotyp der HRS-Zellen besitzen, sondern kleine Zellen sind.

4.2.2 Naive, Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen werden direkt infiziert

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen Rückschlüsse über das Entwicklungsstadium der B-Zellen zu, in dem die Infektion mit EBV erfolgte. Vermutlich werden naive B-Zellen in den Tonsillen direkt mit EBV infiziert, da die Tonsille die Eintrittsstelle des Virus in den Körper ist und während der IM im tonsillären Gewebe verstreut lytische Zellen zu finden sind (Anagnostopoulos et al., 1995; Niedobitek et al., 1997). Die Infektion naiver B-Zellen könnte allerdings auch außerhalb der Tonsillen, z.B. im Blut, stattfinden. Da verschiedene Ansichten über das Vorkommen lytischer Zellen bzw. viraler Partikel im Blut bestehen, erscheint die Infektion naiver B-Zellen im Blut allerdings fraglich (Prang et al., 1997; Rickinson et al., 1975; Tierney et al., 1994). Auch die Infektion naiver B-Zellen oder ihrer Vorläufer im Knochenmark ist denkbar; das Auftreten viraler Partikel im Knochenmark während der IM wurde bisher allerdings nicht untersucht.

Für infizierte Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen sind zwei unterschiedliche Herleitungen vorstellbar: Einerseits ist es möglich, daß Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen direkt infiziert worden sind. Andererseits könnten sich EBV-positive Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen aus infizierten naiven B-Zellen entwickeln, die an einer Keimzentrumsreaktion teilnehmen. Im letzteren Fall sollten sich die Mitglieder einzelner im Keimzentrum gebildeter Klone in den umgelagerten V-Genen durch einzelne Mutationen voneinander unterscheiden (Abschnitt 1.2 und 3.1.3.1). Mit Ausnahme eines Klons wurde diese intraklonale V-Gen-Diversität bei 173 Zellen, die 27 Klonen zugeordnet wurden, nicht beobachtet. Demzufolge proliferieren EBV-positive Zellen (mit seltenen Ausnahmen) ohne Einführung somatischer Mutationen in umgelagerte V-Gene und nehmen folglich nach der Infektion nicht an einer Keimzentrumsreaktion teil. Da sie aber mutierte V-Genumlagerungen besitzen, bedeutet dies gleichzeitig, daß infizierte Keimzentrums-

und/oder Gedächtnis-B-Zellen nicht von infizierten naiven B-Zellen (und/oder Keimzentrums-Gründer-B-Zellen) mit unmutierten V-Genumlagerungen abstammen können (Abbildung 2). Vielmehr wurden Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen nach Einführung somatischer Mutationen in umgelagerten V-Gene direkt infiziert. Falls tatsächlich Keimzentrums-B-Zellen infiziert werden, die bereits Mutationen erhalten haben, sollten diese Zellen nach der Infektion den Prozess der somatischen Hypermutation einstellen und zu Gedächtnis-B-Zell-ähnlichen Zellen differenzieren (siehe auch Abschnitt 4.3.2). Eine mögliche, seltene Teilnahme infizierter B-Zellen an einer Keimzentrumsreaktion wird jedoch durch die bei einem Klon beobachtete geringfügige intraklonale Diversität angedeutet (Abschnitt 3.1.5). Diese beschriebene seltene intraklonale Diversität kann allerdings auch auf eine seltene Induktion der somatischen Hypermutationsaktivität in infizierten, naiven B-Zellen oder die unabhängige Infektion von Mitglieder eines Klons hinweisen, die sich bereits vor Infektion durch einzelne Mutationen voneinander unterschieden (Abschnitt 3.1.5).

Zusammengefaßt wurde also deutlich, daß EBV während der IM sowohl naive und/oder Keimzentrums-Gründer-B-Zellen als auch Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen direkt infiziert. Die Keimzentrumspassage infizierter, naiver B-Zellen spielt offensichtlich keine bedeutende Rolle für die Etablierung des Virus im Gedächtnis-B-Zellkompartiment.

4.2.3 Die Population EBV-infizierter Zellen wird im starken Maße durch Proliferation infizierter Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen gebildet

Neben der Frage nach dem Differenzierungsstadium und der Abstammung EBV-infizierter Zellen erlaubt die durchgeführte Analyse eine Untersuchung des proliferativen Verhaltens infizierter B-Zellen in IM-Tonsillen. Bisher war nicht bekannt, ob EBV während der IM viele Zellen infiziert oder wenige, die sich anschließend durch Zellteilung vermehren. Da in den hier untersuchten Fällen eine Vielzahl von Klonen EBV-infizierter Zellen nachgewiesen wurden, wird offensichtlich, daß EBV sich im

B-Zellkompartiment des Menschen nicht nur durch Infektion vieler B-Zellen sondern auch durch klonale Expansion dieser infizierter Zellen ausbreitet (Abschnitt 3.1.5). Die Ergebnisse von Zellkulturexperimenten legen die Vermutung nahe, daß diese klonale Expansion infizierter Zellen, die auch bei in vitro infizierten B-Zellen beschrieben wird (Casali and Notkins, 1989), durch EBV-kodierte Gene induziert wird: Sowohl die Expression von EBNA2 in Kombination mit der Aktivierung des CD40-Rezeptors als auch in Kombination mit LMP1-Ausprägung kann Zellen zur Proliferation treiben (Kilger et al., 1998; Zimmer-Strobl et al., 1996).

Das Ausmaß der klonalen Expansion unterscheidet sich in den beiden untersuchten Fällen (Fall 1: 78% der informativen Zellen; Fall 2: 32% der informativen Zellen). Der Grund hierfür mag die Dauer der Krankheit vor der Tonsillektomie sein: Die Tonsillektomie wurde in Fall 2 im Vergleich zu Fall 1 in einem späteren Krankheitsstadium durchgeführt. Es ist daher denkbar, daß durch die länger andauernde, EBV-spezifische T-Zellantwort die Mehrzahl der infizierten Zellen eliminiert wurde, so daß die meisten im Gewebe nachgewiesenen infizierten Zellen durch Neuinfektion und nicht durch Proliferation infizierter Zellen entstanden sind. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, daß in Fall 2 ca. 90% der EBV-infizierten Zellen EBNA2 nicht aber LMP1 exprimierten. Wie in Abschnitt 4.1 diskutiert, könnte es sich bei diesen Zellen wenigstens zu einem Teil um neu infizierte Zellen handeln (Alfieri et al., 1991).

Erstaunlicherweise stammt die überwiegende Mehrheit der Klone von infizierten Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen ab, obwohl in allen untersuchten Fällen auch naive und/oder Keimzentrums-Gründer-B-Zellen mit EBV infiziert sind. Dieses proliferative Verhalten EBV-infizierter B-Zellen während der IM steht im Gegensatz zu dem beschriebenen Verhalten EBV-positiver B-Zellen in vitro: Sowohl naive als auch Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen können in vitro infiziert und zur Proliferation getrieben werden (Casali and Notkins, 1989). Die während der IM beobachtete bevorzugte klonale Expansion der Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen könnte u.a. auf der verstärkten Expression von Proteinen beruhen, die an der Aktivierung der

Proliferation nach Infektion beteiligt sind. In einer kürzlich erschienen Genexpressionsanalyse konnte gezeigt werden, daß Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen im Vergleich zu naiven B-Zellen vermehrt positive Regulatoren und vermindert negative Regulatoren des B-Zellrezeptor-Signalweges exprimieren (Feldhahn et al., 2002). Dieses Expressionsmuster spiegelt sich auch in einer größeren Aktivierbarkeit der Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen nach B-Zellrezeptor-Stimulation wider. Falls EBV Teile dieses Signalweges nutzt, um die Proliferation infizierter Zellen zu induzieren, sollten demzufolge Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen nach Infektion leichter zur Proliferation angeregt werden können.

Die Verteilung der Zellen unterschiedlicher B-Zell-Entwicklungsstadien, die unmittelbar vom Virus infiziert wurden, kann folgendermaßen untersucht werden: Wird jeder Klon nur einmal gezählt und somit die Verteilung der verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien unter den infizierten Zellen vor klonaler Expansion betrachtet, sind nur etwa 10% EBV-positiver B-Zellen naive B-Zellen. Dieses Ergebnis ist insofern erstaunlich, als im normalen tonsillären Gewebe etwa 30-50% der B-Zellen naive B-Zellen sind (Bohnhorst et al., 2001). Demzufolge führt neben der präferentiellen Expansion auch die präferentielle Infektion der Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen zur Überrepräsentation von EBV im Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellkompartiment.

Diese Arbeit zeigte weiterhin, daß Zellen mit unterschiedlicher Morphologie Mitglieder gemeinsamer Klone sein können (Abschnitt 3.1.6). Da die Morphologie mit der Ausprägung unterschiedlicher Latenzformen korreliert (Abschnitt 3.1.2), variieren Mitglieder einzelner Klone wahrscheinlich auch in den exprimierten Latenzformen. Solche Änderungen der Latenzformen während klonaler Expansion wurden bereits für in vitro infizierte B-Zellen und BL-Zelllinien beschrieben (Kieff and Rickinson, 2001; Szeles et al., 1999). Durch diese hier gezeigten Wechsel der Latenzform könnten einzelne Mitglieder der Gedächtnis-B-Zellklone schon während der IM eine Latenzform annehmen, die es ihnen ermöglicht, der EBV-spezifische T-Zellantwort zu entgehen.

Infolgedessen könnten einige infizierte Gedächtnis-B-Zellen nach der IM überleben und die anfängliche Population infizierter Gedächtnis-B-Zellen der lebenslangen Infektion bilden, in denen das Virus persistiert (Babcock et al., 1998).

4.3 EBV-infizierte Zellen der Keimzentren

Die Analyse EBV-infizierter Zellen der IFR deutet darauf hin, daß während der IM die Keimzentrumspassage naiver, infizierter B-Zellen für die Etablierung des Virus im Gedächtnis-B-Zellkompartiment möglicherweise keine Rolle spielt (Abschnitt 4.2). Da die Frage nach der Beteiligung EBV-infizierter Zellen an einer Keimzentrumsreaktion sowohl für die Abstammung der infizierten Zellen als auch für die Differenzierungswege dieser Zellen während der IM von entscheidender Bedeutung ist, konzentrierte sich der zweite Teil der Analyse auf EBV-positive B-Zellen, die direkt aus den histologischen Strukturen der Keimzentren von IM-Tonsillen isoliert wurden.

4.3.1 EBV-infizierte Zellen im Keimzentrum nehmen nicht an der Keimzentrumsreaktion teil

Die V-Gen-Sequenzanalyse EBV-infizierter Zellen der Keimzentren zeigte klonale Expansion infizierter Zellen während der IM; intraklonale V-Gen-Diversität - ein Merkmal von Keimzentrums-B-Zellen - wurde allerdings nicht beobachtet (Abschnitt 3.2.5). Demzufolge expandieren diese EBV-infizierten Zellen ohne Einführung von somatischen Mutationen. Da diese Zellen durch mutierte V-Genumlagerungen charakterisiert sind, können sie infolge dieser fehlenden Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion nicht von infizierten naiven B-Zellen abstammen.

Da lytische Zellen verstreut im tonsillären Gewebe und selten auch in Keimzentren nachgewiesen wurden (Anagnostopoulos et al., 1995; Niedobitek et al., 1997), sind zwei Erklärungen zur Herleitung und Entwicklung EBV-infizierter B-Zellen in den Keimzentren denkbar: Einerseits können Keimzentrums-B-Zellen durch EBV infiziert werden, nach Infektion proliferieren und die somatischen Hypermutationsaktivität beenden. Einzelne Mitglieder der entstandenen Keimzentrums-

B-Zellklone differenzieren möglicherweise zu Gedächtnis-B-Zellen (siehe auch Abschnitt 4.3.2), verlassen das Keimzentrum und wandern in die umgebende IFR. Andererseits können EBV-positive Zellen der Keimzentren von Gedächtnis-B-Zellen abstammen, die nach der Infektion proliferieren. Einige Mitglieder der entstandenen Gedächtnis-B-Zellklone gelangen ins Keimzentrum; dort nehmen sie allerdings nicht an der Keimzentrumsreaktion teil.

Während der IM scheinen EBV-infizierte Zellen in geringem Maße im Gewebe zu wandern: Sowohl die Mitglieder infizierter Klone der Patienten 1 und 2 als auch die klonal verwandten, EBV-infizierten B-Zellen der Patienten 3 und 4 können sich in gewisser Entfernung voneinander im tonsillären Gewebe befinden. Die bei den Patienten 1 und 2 beobachtete regionale Begrenzung klonal verwandter Zellen (Abschnitt 3.1.5), spricht allerdings für eine begrenzte Ausbreitung der Mitglieder einzelner Klone im Gewebe während der IM.

Zusammengefaßt zeigte diese Analyse, daß infizierte Zellen nicht an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen, sogar wenn sie sich in Keimzentren befinden und benachbarte, nicht infizierte Keimzentrums-B-Zellen sich an der Keimzentrumsreaktion beteiligen (Abschnitt 3.2.4). Somit bekräftigen diese Ergebnisse die Hypothese, daß während der IM die Keimzentrums Passage infizierter, naiver B-Zellen keine Rolle für die Entwicklung EBV-infizierter Gedächtnis-B-Zellen spielt; vielmehr werden Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen direkt infiziert.

4.3.2 Mögliche Beeinflussung EBV-infizierter Zellen durch die Expression EBV-kodierter Gene

EBV kann auf vielfältige Weise in die Differenzierung infizierter Zellen eingreifen, da viele latente EBV-kodierte Gene funktionelle Ähnlichkeiten mit zellulären Genen besitzen. So könnte die geringe Frequenz EBV-positiver B-Zellen in Keimzentren durch LMP1-Expression verursacht sein. LMP1 ahmt einen aktivierten CD40-Rezeptor nach (Abschnitt 1.4; Kilger et al., 1998; Zimmer-Strobl et al., 1996); CD40 Aktivierung bewirkt die Differenzierung der Keimzentrums-B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen (Abschnitt 1.2;

Arpin et al., 1995; Liu and Banchereau, 1997). Demzufolge ist es denkbar, daß LMP1-positive Keimzentrums-B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren und das Keimzentrum verlassen. Weiterhin könnten LMP1-exprimierende B-Zellen in der IFR am Eintritt ins Keimzentrum gehindert werden (siehe Abschnitt 4.1).

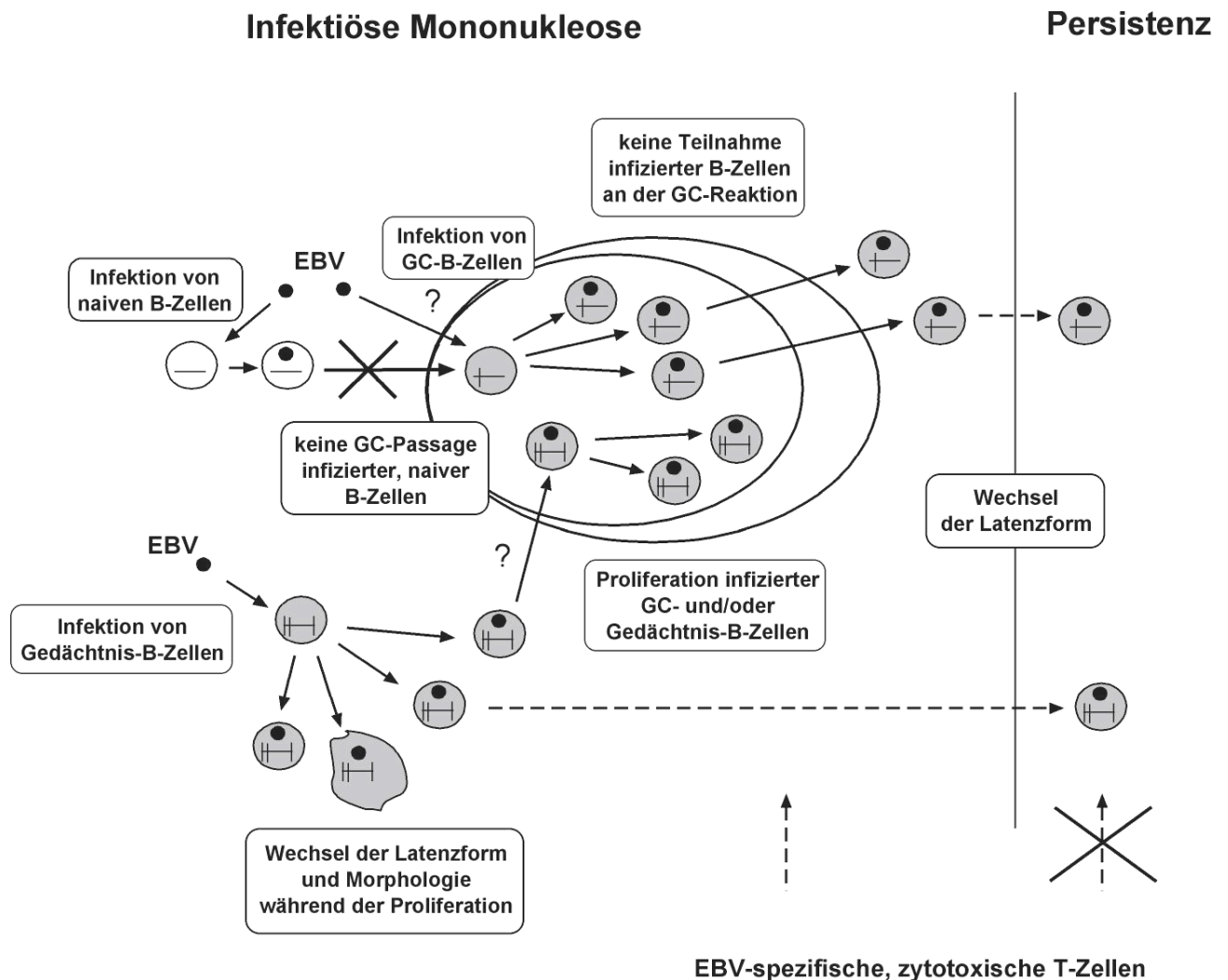
Desweiteren könnte die EBNA2-Expression die somatische Hypermutationsaktivität beeinflussen. In vitro Untersuchungen zeigten, daß durch EBNA2-Expression die Transkription des Ig-Schwerkettenlocus drastisch (um etwa 90%) reduziert wird (Jochner et al., 1996). Da diese Transkription eine Voraussetzung für die somatische Hypermutation ist (Fukita et al., 1998; Peters and Storb, 1996), ist es vorstellbar, daß EBNA2-Expression die fehlende somatische Hypermutationsaktivität in proliferierenden EBV-infizierten B-Zellen der Keimzentren bewirkt. Diese Hypothese stimmt mit einer Reihe von Beobachtungen überein: EBV-positive B-Zellen, die in vivo somatische Hypermutationsaktivität zeigen (BL, angioimmunoblastisches Lymphom und PTLD (Bräuninger et al., 2001b; Chapman et al., 1995; persönliche Mitteilung Andreas Bräuninger), zeigen keine EBNA2-Expression. Im Gegensatz dazu wurde in Fällen von PTLD, in denen EBV die Latenz III und somit EBNA2 ausprägt, keine somatische Hypermutationsaktivität beobachtet (persönliche Mitteilung Andreas Bräuninger). In zwei BL-Zelllinien konnte jedoch somatische Hypermutation trotz EBNA2-Expression nachgewiesen werden (Harris et al., 2001). Der Grund für diese Diskrepanz liegt möglicherweise in der konstitutiven somatischen Hypermutationsaktivität der beiden beschriebenen BL-Zelllinien, welche für B-Zellen untypisch ist. Aufgrund der Korrelation der Mutationsrate mit der Transkription wird spekuliert, daß während der Transkription ein Komplex von Proteinen auf die DNA geladen wird, der die Mutationen direkt in den transkribierten Bereich des V-Gens einführt (Peters and Storb, 1996). Die Überexpression wichtiger Komponenten dieses Komplex in den zwei beschriebenen BL-Zelllinien könnte nicht nur zur konstitutiven somatischen Hypermutationsaktivität der Zelllinien führen, sondern auch die durch EBNA2 induzierten Effekte auf die Transkription des Schwerkettenlocus kompensieren. Desweiteren könnte die

Transkriptionsrate in den Zelllinien so stark dereguliert sein, daß die durch EBNA2 induzierte Reduzierung der Transkriptionsrate keinen Effekt auf die somatische Hypermutationsaktivität zeigt.

Neben einem möglichen Eingriff in die Keimzentrumsreaktion könnten EBV-kodierte Gene auch die Proliferation infizierter Zellen verursachen. Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 diskutiert, kann die Proliferation infizierter B-Zellen in vitro sowohl durch EBNA2-Expression in Kombination mit LMP1-Ausprägung als auch in Kombination mit Aktivierung des CD40-Rezeptors bewirkt werden (Kilger et al., 1998; Zimmer-Strobl et al., 1996). Demnach kann die Expansion LMP1⁻, EBNA2⁺ B-Zellen in Keimzentren durch die gleichzeitige EBNA2-Expression und die Aktivierung des CD40-Rezeptors hervorgerufen werden. Aufgrund des CD40-Stimulus sollten diese Zellen daraufhin die Keimzentren verlassen und zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren (Arpin et al., 1995). Die Expansion EBV-positiver B-Zellen außerhalb der Keimzentren könnte hingegen durch die Expression von EBNA2 und LMP1 verursacht werden.

4.4 Modell zur Ausbreitung von EBV im B-Zellkompartiment und der Differenzierung infizierter B-Zellen während der IM

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann ein Szenario über die schnelle und effiziente Ausbreitung des Virus im B-Zellkompartiment während der IM aufgestellt werden. Nach Übertragung viraler Partikel durch den Speichel und Eindringen dieser Viren in die Tonsille bildet EBV durch direkte Infektion naiver und vor allen Dingen Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen eine umfangreiche Population infizierter B-Zellen (Abbildung 9, Abschnitt 4.2.2). Die Zahl EBV-positiver B-Zellen im tonsillären Gewebe wird darüberhinaus durch Proliferation infizierter B-Zellen vergrößert. Diese klonale Expansion scheint weitgehend auf Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen beschränkt zu sein (Abbildung 9, Abschnitt 4.2.3). Die Keimzentrums- und Gedächtnis-B-Zellen infizierter, naiver B-Zellen spielt während der IM offenbar keine Rolle für die Etablierung des Virus im Gedächtnis-B-Zellkompartiment, da sogar EBV-infizierte B-Zellen, die sich in Keimzentren befinden, keine Anzeichen für eine Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion zeigen (Abbildung 9, Abschnitt 4.3.1). Neben den beschriebenen klassischen Latenzformen wird während der IM eine bisher unbekannte Latenzform ausgeprägt (EBNA2⁺, LMP1⁻); EBV nimmt in der Mehrzahl infizierter Zellen der IFR sowie in nahezu allen infizierten Zellen der Keimzentren diese Latenzform an (Abschnitt 4.1). Während der Expansion können EBV-infizierte Zellen ihre Morphologie und wahrscheinlich auch die ausgeprägte Latenzform verändern und auf diese Weise vermutlich der EBV-spezifischen, zytotoxischen T-Zellantwort entgehen (Abbildung 9, Abschnitt 4.2.3). Aufgrund der Überrepräsentation des Virus unter Gedächtnis- und/oder Keimzentrums-B-Zellen (letztere differenzieren möglicherweise nach der Infektion zu Gedächtnis-B-Zellen, Abschnitt 4.3.2) können wahrscheinlich einige infizierte Gedächtnis-B-Zellen nach der IM überleben und die lebenslange Persistenz in Gedächtnis-B-Zellen entwickeln (Abbildung 9).

Abbildung 9. Modell der Ausbreitung von EBV im B-Zellkompartiment während der IM

Schwarze Kreise: EBV; weiße Kreise: B-Zellen mit unmutierten V-Genen; graue Kreise B-Zellen mit mutierten V-Genen; horizontale Striche: V-Genumlagerungen; vertikale Striche: somatische Mutationen; GC: Keimzentrum. Zellen mit unregelmäßiger Form stellen HRS-ähnliche Zellen dar; sowohl naive als auch Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen können diese Morphologie annehmen (hier nicht für naive B-Zellen gezeigt).

Ausbreitung des Virus während IM durch Infektion naiver, Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen und Proliferation infizierter Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen. Infizierte B-Zellen im Keimzentrum nehmen nicht an der Keimzentrumsreaktion teil. Diese Population infizierter B-Zellen im Keimzentrum wird möglicherweise durch Infektion von Keimzentrums-B-Zellen gebildet, die nach der Infektion proliferieren. Alternativ infiziert EBV Gedächtnis-B-Zellen, die ins Keimzentrum einwandern. Die Keimzentrums Passage infizierter, naiver B-Zellen spielt während der IM keine Rolle für die Etablierung des Virus im Gedächtnis-B-Zellkompartiment. Während der Proliferation können infizierte Zellen die Morphologie und vermutlich auch die Latenzform wechseln. Einige infizierte Gedächtnis-B-Zellen überleben möglicherweise nach der IM und bilden die anfängliche Population EBV-infizierter B-Zellen während der Persistenz.

4.4.1 Vergleich der Modelle zur Ausbreitung des Virus im B-Zellkompartiment während IM und Persistenz

Ein weiteres Modell zur Ausbreitung des Virus im B-Zellkompartiment wurde aufgrund der Analyse EBV-infizierter B-Zellen während der Persistenz entwickelt (Abschnitt 1.5; Babcock et al., 2000). Diesem Modell zufolge gelangt EBV nicht durch direkte Infektion in das Gedächtnis-B-Zellkompartiment. Vielmehr infiziert das Virus naive B-Zellen und nutzt die Prozesse der B-Zellentwicklung im Keimzentrum aus, um sich im Gedächtnis-B-Zellkompartiment, dem viralen Reservoir während der Persistenz, zu etablieren (Babcock et al., 2000).

Die in diesem Modell postulierte Keimzentrums Passage EBV-infizierter, LMP1-exprimierender B-Zellen widerspricht zum einen den Ergebnissen B-Zell-spezifischer, LMP1-transgener Mäuse, welche eine Unvereinbarkeit der LMP1-Ausprägung und der Differenzierung LMP1-positiver B-Zellen zu Keimzentrums-B-Zellen vermuten lassen (Abschnitt 4.1; Uchida et al., 1999). Zum anderen wird die angenommene Teilnahme infizierter Zellen an einer Keimzentrumsreaktion durch die Ergebnissen histologischer Untersuchungen in Frage gestellt, bei denen in den meisten Fällen persistenter Infektion keine infizierten Zellen in Keimzentren nachgewiesen wurden (Abschnitt 1.5; Araujo et al., 1999; Kobayashi et al., 1998; Tilmann Spieker persönliche Mitteilung). Diese Daten histologischer Untersuchungen stehen jedoch nur scheinbar im Widerspruch zum oben beschriebenen Modell: Da Keimzentren von wenigen Keimzentrums-Gründerzellen abstammen und zumindest in der späten Phase der Keimzentrumsentwicklung eine oligoklonale Population von ein bis sechs Klonen darstellen (Jacob et al., 1991; Kroese et al., 1987; Küppers et al., 1993; Liu et al., 1991), sind bei Keimzentrums Passage infizierter B-Zellen wenige Keimzentren mit einer großen Anzahl EBV-positiver Zellen zu erwarten. Infolge der geringen Frequenz infizierter Keimzentrums-B-Zellen während der Persistenz (etwa eine von 10^6 Keimzentrums-B-Zellen) sind diese Keimzentren mit vielen EBV-infizierten Zellen sehr selten und wurden daher möglicherweise in der Mehrzahl der untersuchten Fälle nicht identifiziert.

Das Szenario von Babcock et al. steht im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit aufgestellten Modell zur Ausbreitung des Virus während der IM. Sowohl das Infektionsverhalten des Virus als auch die Differenzierungswege infizierter Zellen, welche die Etablierung einer infizierten Gedächtnis-B-Zellpopulation gewährleisten, scheinen bei IM und Persistenz grundsätzlich unterschiedlich zu sein: Im Gegensatz zur Persistenz nehmen während der IM EBV-positive B-Zellen wahrscheinlich nicht an der Keimzentrumsreaktion teil (Abschnitt 4.3). Vielmehr infiziert EBV während der IM Gedächtnis-B-Zellen direkt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß bereits infizierte Gedächtnis-B-Zellen in die hier untersuchten Keimzentren eingewandert sind ohne an der Keimzentrumsreaktion teilzunehmen (Abschnitt 4.3), und daß während der IM sehr selten Keimzentren entstehen, in denen EBV-infizierte Zellen an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen.

Die postulierte, unterschiedliche Ausbreitung des Virus während der Persistenz und der IM könnte durch Unterschiede im Virustiter, der Frequenz ausgeprägter Latenzformen sowie der EBV-spezifischen T-Zellantwort bedingt sein. So liegen die unterschiedlichen Latenzformen der B-Zellen der Keimzentren während IM und Persistenz möglicherweise dem unterschiedlichen Verhalten dieser B-Zellen zugrunde: Im Gegensatz zu infizierten Keimzentrums-B-Zellen während der IM in Latenz IV könnten Keimzentrums-B-Zellen während der Persistenz in Latenz II an der Keimzentrumsreaktion teilnehmen (Babcock et al., 2000). Da EBNA2 während der Persistenz nur in naiven B-Zellen (Babcock et al., 2000), während der IM jedoch auch in Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.1.4), wird schließlich die Annahme bekräftigt, daß die Ausbreitung des Virus während der Persistenz und der IM tatsächlich auf unterschiedliche Weisen erfolgt.

4.5 Vergleich EBV-infizierter Zellen mit Tumorzellen EBV-assoziiierter B-Zell-Lymphome

Für mehrere B-Zell-Lymphome wurde eine Assoziation mit EBV beschrieben (Abschnitt 1.6). Es ist daher von Interesse, Merkmale der Tumorzellen mit denen EBV-positiver B-Zellen der IM zu vergleichen, um Zellen mit Charakteristika nicht maligner Tumovorläuferzellen unter den EBV-infizierten Zellen der IM zu identifizieren. Hierzu wurden sowohl das Muster der somatischen Hypermutation als auch die Latenzform der Tumorzellen den entsprechenden Charakteristika EBV-infizierter B-Zellen der IM gegenübergestellt.

HRS-ähnliche Zellen der IM zeigten im Gegensatz zu den HRS-Zellen des MH keine destruktiven Mutationen (Abschnitt 3.3.1). Demzufolge korreliert die HRS-Zell-ähnliche Morphologie nicht mit der Abstammung von präapoptotischen Keimzentrums-B-Zellen. Ferner scheint die Keimzentrums Passage keine Voraussetzung für die Bildung der HRS-ähnlichen Zellen in der IM zu sein, da über 10% der HRS-ähnlichen Zellen der IM durch unmutierte V-Genomlagerungen charakterisiert waren (Abschnitt 3.3.1). Desweiteren zeigen im Unterschied zu den HRS-Zellen des MH einige HRS-ähnliche Zellen der IM die Latenzform III (Abschnitt 3.3.1). Demzufolge ist die Morphologie z.T. unabhängig von der Latenzform.

Der Vergleich EBV-assoziiierter B-Zell-Lymphome (BL, MH und PTLD), die wahrscheinlich vom Keimzentrum abstammen, mit EBV-positiven B-Zellen der Keimzentren zeigte, daß sich das Expressionsmuster EBV-kodierter Gene sowie das Muster der somatischen Mutationen dieser Zellen unterscheidet (Abschnitt 3.3.2). Demzufolge ist es denkbar, daß Vorläufer der Tumorzellen sowohl unter morphologisch-ähnlichen Zellen (HRS-ähnliche Zellen) als auch unter Zellen, die vermutlich vom gleichen B-Zell-Entwicklungsstadium abstammen (EBV⁺ B-Zellen in den Keimzentren) sehr selten sind und deshalb unter den hier analysierten Zellen nicht identifiziert werden konnten. Alternativ entwickeln sich diese EBV-infizierten Zellen mit Merkmalen der Tumorzellen möglicherweise nicht im Verlauf der IM sondern nur in

anderen Situationen. So könnten HRS-ähnliche Zellen nach der IM überleben, erneut in Keimzentren einwandern und sich nach Einführung von destruktiven Mutationen zu Tumorstromazellen des MH entwickeln.

4.6 Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell zur Ausbreitung von EBV während der IM unterscheidet sich in vielen Punkten von dem Modell, das für die virale Persistenz aufgestellt wurde (Abschnitt 4.4.1). Unterschiede in der Ausbreitung des Virus könnten u.a auf unterschiedliche Frequenzen der ausgeprägten, viralen Latenzformen während der IM und der Persistenz zurückzuführen sein (Abschnitt 4.4.1). So ist es denkbar, daß die Transkription der Ig-Loci und somit die somatische Hypermutationsaktivität nur in EBNA2-exprimierenden Zellen in Latenz IV (LMP1⁻, EBNA2⁺) beeinflußt wird (Abschnitt 4.3.2). Es ist daher von Interesse, eine Korrelation zwischen EBNA2-Expression, Transkription der Ig-Loci und somatischer Hypermutation in BL-Zelllinien zu untersuchen, die in Kultur somatische Mutationen in V-Genumlagerungen einführen. Diese Analyse könnte auch BL-Zelllinien einschließen, die nur nach Stimulation somatische Hypermutationsaktivität besitzen, und daher - im Gegensatz zu den hier diskutierten BL-Zelllinien (Abschnitt 4.3.2) - möglicherweise die postulierte Korrelation zeigen. Desweiteren stellt sich die Frage, ob die für die somatische Hypermutationsaktivität notwendige AID-Expression (Abschnitt 1.2) durch die Ausprägung EBV-kodierter Gene in Latenz IV reprimiert wird. Dies könnte durch die Analyse der AID-Ausprägung in EBV-infizierten B-Zellen der Keimzentren sowie durch die Untersuchung der Beeinflussung der AID-Expression durch EBV-kodierte Proteine überprüft werden. Schließlich ist die Expressionstudie der latenten, viralen Genprodukte während der hier beschriebenen Latenz IV von Interesse; hierdurch würde geklärt, ob in dieser Latenz neben LMP1 weitere EBNA2-regulierte, virale Gene nicht ausgeprägt werden.

EBV-infizierte Zellen der IM und der Persistenz wurden mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Bei der RT-PCR-Analyse isolierter B-Zellpopulationen der Persistenz wurden infizierte Keimzentrums-B-Zellen aufgrund der Expression spezifischer Oberflächenantigene identifiziert. Bei der V-Gen-Analyse mikromanipulierter EBV-infizierter Zellen von IM-Tonsillen diente der Nachweis

intraklonaler V-Gen-Diversität als Merkmal für die Teilnahme infizierter B-Zellen an einer Keimzentrumsreaktion. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Untersuchungen könnten daher artifiziell durch die unterschiedlichen, verwendeten Methoden verursacht worden sein. So könnte die Expression der Oberflächenantigene durch die Ausprägung viraler Proteine verändert werden, wie z.B. für die Expression von CD10 beschrieben (Kieff and Rickinson, 2001). Während der IM sind hingegen möglicherweise nur sehr selten Keimzentren vorhanden, in denen infizierte Zellen an der Keimzententumsreaktion teilnehmen. Daher ist es denkbar, daß diese Keimzentren in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden konnten. Um zu klären, ob EBV sich während der IM und der Persistenz tatsächlich auf unterschiedliche Weise im B-Zellkompartiment ausbreitet, sollten EBV-infizierte Zellen der IM und/oder der Persistenz mit beiden beschriebenen Methoden untersucht werden. So könnten z.B. zur Untersuchung der Persistenz EBV-infizierte Zellen der Keimzentren aus tonsillären Schnitten isoliert werden und die Teilnahme dieser Zellen an der Keimzentrumsreaktion durch V-Gen-Analyse untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Während die Primärinfektion mit Epstein-Barr Virus (EBV) in der Kindheit gewöhnlich asymptomatisch verläuft, manifestiert sich die verzögerte Primärinfektion während der Pubertät in ca. 50% der Fälle als infektiöse Mononukleose (IM). Da bislang nur wenige Untersuchungen am Gewebe von IM-Patienten durchgeführt wurden, ist nur wenig über die Vorgänge während der IM bekannt.

Um die Ausbreitung des Virus während der IM nachzuzeichnen, wurden in der vorliegenden Arbeit einzelne EBV-infizierte Zellen aus tonsillärem Gewebe isoliert und mittels Einzelzell-PCR auf Immunoglobulin-V-Genumlagerungen untersucht. Zusätzlich wurde das Spektrum der während der IM ausgeprägten Expressionsmuster EBV-kodierter Gene bestimmt. Diese Untersuchung zeigte, daß nur ein Teil der EBV-positiven Zellen durch die bekannten Latenzformen charakterisiert sind; die Mehrzahl infizierter Zellen der interfollikulären Regionen sowie (fast) alle EBV-positiven Zellen der Keimzentren zeigen eine bislang nicht beschriebene Latenzform (Latenz IV), in der EBNA2 nicht jedoch LMP1 ausgeprägt wird.

Neben wenigen Zellen mit unmutierten V-Genumlagerungen können die meisten EBV-infizierten Zellen Klonen mit mutierten V-Genen zugeordnet werden. Intraklonale V-Gen-Diversität, ein Merkmal von Keimzentrums-B-Zellen, konnte nicht gefunden werden. Diese Ergebnisse der V-Gen-Analyse verdeutlichen folgende Strategien des Virus, um sich während der IM schnell und effektiv im B-Zellkompartiment zu etablieren. EBV infiziert naive und vor allen Dingen Gedächtnis- und/oder Keimzentrums-B-Zellen direkt. Weiterhin können infizierte Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen zu großen Klonen expandieren (Keimzentrums-B-Zellen differenzieren nach der Infektion möglicherweise zu Gedächtnis-B-Zellen). Durch diese bevorzugte Infektion und klonale Expansion der Keimzentrums- und/oder Gedächtnis-B-Zellen etabliert sich EBV schon während der IM im Gedächtnis-B-Zellkompartiment, dem Hauptreservoir des Virus während der Persistenz. Die Keimzentrumspassage infizierter, naiver B-Zellen spielt während der IM hingegen keine Rolle für die Bildung einer Population infizierter

Gedächtnis-B-Zellen, da sogar infizierte B-Zellen, die sich in den Keimzentren befinden, keine Anzeichen für eine Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion zeigen. EBV-infizierte B-Zellen können während der Proliferation die Morphologie und wahrscheinlich auch die Latenzform wechseln. Infolgedessen entgehen vermutlich einige infizierte Gedächtnis-B-Zellen durch Herunterregulation immunogener EBV-kodierter Proteine der EBV-spezifischen Immunantwort und bilden eine nach der IM fortbestehende Population infizierter Gedächtnis-B-Zellen.

EBV ist bei einer Reihe von B-Zell-Lymphomen entscheidend an der Entstehung der Tumore beteiligt. Um Zellen mit Charakteristika möglicher Tumovorläuferzellen während der IM zu identifizieren, wurden daher in der vorliegenden Arbeit die Latenzform und das Muster der somatischen Hypermutation einiger EBV-assoziiierter B-Zell-Lymphome (Burkitt-Lymphom, Morbus Hodgkin und Posttransplantationslymphom) mit den entsprechenden Merkmalen EBV-infizierter Zellen der IM verglichen. Während der IM wurden allerdings keine EBV-infizierten Zellen gefunden, welche Merkmale der Tumorzellen EBV-assoziiierter Lymphome besaßen.

6 ABSTRACT

Primary Epstein-Barr virus (EBV) infection usually occurs in childhood and is generally asymptomatic, but delayed primary infection may manifest itself in a disease called infectious mononucleosis (IM). Although it is known that during IM B cells are the main target of EBV, remarkably little is known about the strategies of viral spreading in the B cell compartment. In order to trace these pathways of viral dissemination, single EBV-infected cells were isolated by micromanipulation from tonsils of IM patients and analysed for rearranged immunoglobulin V genes. In addition, the expression patterns of EBV-encoded genes were characterised: besides cells showing the described latency programs (latency I, II and III), the majority of infected cells in the interfollicular region and most if not all EBV-harboring cells in germinal centers (GC) exhibited a previously unrecognised EBV gene expression pattern (latency IV) in that they were positive for EBNA2, but negative for LMP1.

Beside some cells characterised by unmutated V genes, most EBV-infected cells belong to clones of cells harbouring somatically mutated V gene rearrangements. However, there was no evidence for ongoing somatic hypermutation, a hallmark of the GC reaction. This revealed the following strategies of EBV for the rapid and massive spread in the B cell compartment: the direct infection of naive and in particular memory and/or GC B cells and the expansion of the latter cells to large clones. The GC passage of infected naive B cells does not detectably contribute to the generation of virus-harboring memory B cells during IM; even infected B cells located in GC do not show signs of ongoing V gene hypermutation and thus do not participate in the GC reaction. Hence, the preferential direct infection and preferential expansion of memory and/or GC B cells may be part of the viral strategy to establish itself during IM in the memory B cell compartment. Members of memory B cell clones can show distinct morphologies and likely also EBV gene expression patterns implying a mechanism by which EBV-infected B cells can evade immune surveillance and establish a pool of persisting EBV-positive memory B cells.

Although the three main types of EBV-associated B cell lymphomas (Burkitt, Hodgkin and post transplant lymphomas) are presumably derived from EBV-infected B cells, no EBV-harboring cells were found during IM that resembled the tumor cells of these EBV-associated lymphomas in terms of EBV latency program and somatic hypermutation pattern.

7 LITERATUR

- Alexander, F. E., Jarrett, R. F., Lawrence, D., Armstrong, A. A., Freeland, J., Gokhale, D. A., Kane, E., Taylor, G. M., Wright, D. H., and Cartwright, R. A. (2000). Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents, *Br J Cancer* **82**, 1117-1121.
- Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes, *Virology* **181**, 595-608.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., and Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus, *Blood* **85**, 744-750.
- Araujo, I., Foss, H.-D., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Barbosa, H. S., Bittencourt, A., and Stein, H. (1999). Frequent expansion of Epstein-Barr virus (EBV) infected cells in germinal centres of tonsils from an area with a high incidence of EBV-associated lymphoma, *J Pathol* **187**, 326-330.
- Arpin, C., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1995). Generation of memory B cells and plasma cells in vitro, *Science* **268**, 720-722.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science* **284**, 770-776.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D. A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo, *Immunity* **9**, 395-404.
- Babcock, G. J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A. D. (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell, *Immunity* **13**, 497-506.
- Bar, R. S., DeLor, C. J., Clausen, K. P., Hurtubise, P., Henle, W., and Hewetson, J. F. (1974). Fatal infectious mononucleosis in a family, *N Engl J Med* **290**, 363-367.
- Beaufils, P., Choquet, D., Mamoun, R. Z., and Malissen, B. (1993). The (YXXL/I)2 signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events, *Embo J* **12**, 5105-5112.
- Berek, C., Berger, A., and Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers, *Cell* **67**, 1121-1129.
- Betz, A. G., Neuberger, M. S., and Milstein, C. (1995). Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes., *Immunol Today* **14**, 405-411.
- Betz, A. G., Rada, C., Pannell, R., Milstein, C., and Neuberger, M. S. (1993). Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots, *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2385-2388.
- Bohnhorst, J. O., Bjorgan, M. B., Thoen, J. E., Natvig, J. B., and Thompson, K. M. (2001). Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome, *J Immunol* **167**, 3610-3618.
- Both, G. W., Taylor, L., Pollard, J. W., and Steele, E. J. (1990). Distribution of mutations around rearranged heavy-chain antibody variable-region genes., *Mol Cell Biol* **10**, 5187-5196.
- Bräuninger, A., Goossens, T., Rajewsky, K., and Küppers, R. (2001a). Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human, *Eur J Immunol* **31**, 3631-3637.
- Bräuninger, A., Hansmann, M.-L., Strickler, J. G., Dummer, R., Burg, G., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1999a). Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma, *N Engl J Med* **340**, 1239-1247.

- Bräuninger, A., Küppers, R., Spieker, T., Siebert, R., Strickler, J. G., Schlegelberger, B., Rajewsky, K., and Hansmann, M. L. (1999b). Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells, *Blood* 93, 2679-2687.
- Bräuninger, A., Küppers, R., Strickler, J. G., Wacker, H. H., Rajewsky, K., and Hansmann, M.-L. (1997). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9337-9342 (correction appeared in *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14211 (1997)).
- Bräuninger, A., Spieker, T., Willenbrock, K., Gaulard, P., Wacker, H. H., Rajewsky, K., Hansmann, M. L., and Küppers, R. (2001b). Survival and clonal expansion of mutating "forbidden" (immunoglobulin receptor-deficient) epstein-barr virus-infected B cells in angioimmunoblastic T cell lymphoma, *J Exp Med* 194, 927-940.
- Brezinschek, H. P., Brezinschek, R. I., and Lipsky, P. E. (1995). Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction, *J Immunol* 155, 190-202.
- Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Brezinschek, R. I., Dorner, T., Domiati-Saad, R., and Lipsky, P. E. (1997). Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells, *J Clin Invest* 99, 2488-2501.
- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Demolliere, C., Rajewsky, K., and Jacobs, H. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation, *Immunity* 13, 589-597.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals, *Immunity* 9, 405-411.
- Callan, M. F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J. D., Moss, P. A., Gillespie, G. M., Bell, J. I., Rickinson, A. B., and McMichael, A. J. (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis, *Nat Med* 2, 906-911.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., and Rickinson, A. B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus in vivo, *J Exp Med* 187, 1395-1402.
- Casali, P., and Notkins, A. L. (1989). Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes, *Annu Rev Immunol* 7, 513-535.
- Casellas, R., Shih, T.-A., Kleinewietfeld, M., Raconjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C. (2001). Receptor editing makes a major contribution to the antibody repertoire, *Science* 291, 1541-1544.
- Cattoretti, G., Chang, C. C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B. H., Falini, B., Louie, D. C., Offit, K., Chaganti, R. S. K., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells, *Blood* 86, 45-53.
- Cattoretti, G., Zhang, J., Cleary, A. M., Lederman, S., Gaidano, G., Carbone, A., Chaganti, R. S. K., and Dalla-Favera, R. (1997). Downregulation of BCL-6 gene expression by CD40 and EBV latent membrane protein-1 (LMP-1) and its block in lymphoma carrying BCL-6 rearrangements., *Blood* 90 (Suppl. 1), 175a.
- Chapman, C. J., Mockridge, C. I., Rowe, M., Rickinson, A. B., and Stevenson, F. K. (1995). Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity, *Blood* 85, 2176-2181.
- Chen, C. L., Sadler, R. H., Walling, D. M., Su, I. J., Hsieh, H. C., and Raab-Traub, N. (1993). Epstein-Barr virus (EBV) gene expression in EBV-positive peripheral T-cell lymphomas, *J Virol* 67, 6303-6308.
- Chen, F., Zou, J. Z., di Renzo, L., Winberg, G., Hu, L. F., Klein, E., Klein, G., and Ernberg, I. (1995). A subpopulation of normal B cells latently infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1, *J Virol* 69, 3752-3758.

- Clarke, P. A., Sharp, N. A., Arrand, J. R., and Clemens, M. J. (1990a). Epstein-Barr virus gene expression in interferon-treated cells. Implications for the regulation of protein synthesis and the antiviral state, *Biochim Biophys Acta* 1050, 167-173.
- Clarke, P. A., Sharp, N. A., and Clemens, M. J. (1990b). Translational control by the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1. Reversal of the double-stranded RNA-induced inhibition of protein synthesis in reticulocyte lysates, *Eur J Biochem* 193, 635-641.
- Coffey, A. J., Brooksbank, R. A., Brandau, O., Ohashi, T., Howell, G. R., Bye, J. M., Cahn, A. P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., *et al.* (1998). Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene, *Nat Genet* 20, 129-135.
- Cook, G. P., Tomlinson, I. M., Walter, G., Riethman, H., Carter, N. P., Buluwela, L., Winter, G., and Rabbits, T. H. (1994). A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q., *Nature Genet* 7, 162-168.
- Corbett, S. J., Tomlinson, I. M., Sonnhhammer, E. L. L., Buck, D., and Winter, G. (1997). Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: A systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination., *J Mol Biol* 270, 587-597.
- Dalla-Favera, R., Migliazza, A., Chang, C. C., Niu, H., Pasqualucci, L., Butler, M., Shen, Q., and Cattoretti, G. (1999). Molecular pathogenesis of B cell malignancy: the role of BCL-6., *Curr Top Microbiol Immunol* 246, 257-263.
- Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors, *Annu Rev Immunol* 16, 523-544.
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6, *Science* 276, 589-592.
- Di Noia, J., and Neuberger, M. S. (2002). Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase., *Nature* 419, 43-48.
- Diaz, M., and Casali, P. (2002). Somatic immunoglobulin hypermutation, *Curr Opin Immunol* 14, 235-40.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. W. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma., *Lancet* 1, 702-703.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Gueranger, Q., Reynaud, C. A., and Weill, J. C. (2002). Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota, *Nature* 419, 944-947.
- Feldhahn, N., Schwering, I., Lee, S., Wartenberg, M., Klein, F., Wang, H., Zhou, G., Wang, S. M., Rowley, J. D., Hescheler, J., *et al.* (2002). Silencing of B Cell Receptor Signals in Human Naive B Cells, *J Exp Med* 196, 1291-1305.
- Fukita, Y., Jacobs, H., and Rajewsky, K. (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription, *Immunity* 9, 105-114.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins, *Embo J* 18, 3064-3073.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule, *EMBO J* 16, 6131-6140.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., and *et al.* (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice, *Nature* 334, 676-682.
- Goossens, T., Brauninger, A., Klein, U., Kuppers, R., and Rajewsky, K. (2001). Receptor revision plays no major role in shaping the receptor repertoire of human memory B cells after the onset of somatic hypermutation, *Eur J Immunol* 31, 3638-3648.

- Goossens, T., Klein, U., and Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: Implications for oncogene translocations and heavy chain disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2463-2468.
- Gordadze, A. V., Peng, R., Tan, J., Liu, G., Sutton, R., Kempkes, B., Bornkamm, G. W., and Ling, P. D. (2001). Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus, *J Virol* 75, 5899-5912.
- Gregory, C. D., Edwards, C. F., Milner, A., Wiels, J., Lipinski, M., Rowe, M., Tursz, T., and Rickinson, A. B. (1988). Isolation of a normal B cell subset with a Burkitt-like phenotype and transformation in vitro with Epstein-Barr virus, *Int J Cancer* 42, 213-220.
- Gutensohn, N., and Cole, P. (1980). Epidemiology of Hodgkin's disease, *Semin Oncol* 7, 92-102.
- Haan, K. M., Kwok, W. W., Longnecker, R., and Speck, P. (2000). Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor, *J Virol* 74, 2451-2454.
- Haan, K. M., and Longnecker, R. (2000). Coreceptor restriction within the HLA-DQ locus for Epstein-Barr virus infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9252-9257.
- Harabuchi, Y., Yamanaka, N., Kataura, A., Imai, S., Kinoshita, T., Mizuno, F., and Osato, T. (1990). Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma, *Lancet* 335, 128-130.
- Harris, R. S., Croom-Carter, D. S., Rickinson, A. B., and Neuberger, M. S. (2001). Epstein-Barr virus and the somatic hypermutation of immunoglobulin genes in Burkitt's lymphoma cells, *J Virol* 75, 10488-10492.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C. D., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A. B. (1991). Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death., *Cell* 65, 1107-1115.
- Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis, *Proc Natl Acad Sci USA* 59, 94-101.
- Herbst, H., Dallenbach, F., Hummel, M., Niedobitek, G., Pileri, S., Muller-Lantzsch, N., and Stein, H. (1991). Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4766-4770.
- Hieter, P. A., Maizel, J. V., and Leder, P. (1982). Evolution of human immunoglobulin κ J region genes., *J Biol Chem* 257, 1516-1522.
- Irsch, J., Nitsch, S., Hansmann, M.-L., Rajewsky, K., Tesch, H., Diehl, V., Jox, A., Küppers, R., and Radbruch, A. (1998). Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10117-10122.
- Isaacson, P. G., Schmid, C., Pan, L., Wotherspoon, A. C., and Wright, D. H. (1992). Epstein-Barr virus latent membrane protein expression by Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in acute infectious mononucleosis, *J Pathol* 167, 267-271.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991). Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres, *Nature* 354, 389-392.
- Jacobs, J., and Kelsoe, G. (1992). In situ studies of the primary immune response to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers., *J Exp Med* 176, 679-687.
- Jochner, N., Eick, D., Zimmer-Strobl, U., Pawlita, M., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin μ gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells, *EMBO J* 15, 375-382.
- Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E., and Grossman, S. R. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1, *J Virol* 69, 253-262.
- Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R. R., Sciotto, C. G., Wahl, R., Sands, J., Gottman, D., Katz, B. Z., and Sklar, J. (1988). T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections, *N Engl J Med* 318, 733-741.

- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2, *J Virol* 73, 4481-4484.
- Kanzler, H., Hansmann, M. L., Kapp, U., Wolf, J., Diehl, V., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1996a). Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient, *Blood* 87, 3429-3436.
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M.-L., and Rajewsky, K. (1996b). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells, *J Exp Med* 184, 1495-1505.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation, *Immunity* 1, 167-178.
- Kelsoe, G. (1996). Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* 4, 107-111.
- Kieff, E., and Rickinson, A. B. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. In Fields' Virology, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), pp. 2511-2573.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and Hammerschmidt, W. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade, *Embo J* 16, 6478-6485.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulated an activated CD40 receptor, *EMBO J* 17, 1700-1709.
- Kim, S. H., Choi, E. Y., Shin, Y. K., Kim, T. J., Chung, D. H., Chang, S. I., Kim, N. K., and Park, S. H. (1998). Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype through downregulation of CD99 (Mic2), *Blood* 92, 4287-4295.
- Kim, S. H., Shin, Y. K., Lee, I. S., Bae, Y. M., Sohn, H. W., Suh, Y. H., Ree, H. J., Rowe, M., and Park, S. H. (2000). Viral latent membrane protein 1 (LMP-1)-induced CD99 down-regulation in B cells leads to the generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype, *Blood* 95, 294-300.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells, *Immunol Rev* 162, 261-280.
- Knecht, H., McQuain, C., Martin, J., Rothenberger, S., Drexler, H. G., Berger, C., Bachmann, E., Kittler, E. L., Odermatt, B. F., and Quesenberry, P. J. (1996). Expression of the LMP1 oncoprotein in the EBV negative Hodgkin's disease cell line L-428 is associated with Reed-Sternberg cell morphology, *Oncogene* 13, 947-953.
- Kobayashi, R., Takeuchi, H., Sasaki, M., Hasegawa, M., and Hirai, K. (1998). Detection of Epstein-Barr virus infection in the epithelial cells and lymphocytes of non-neoplastic tonsils by in situ hybridization and in situ PCR, *Arch Virol* 143, 803-813.
- Kocks, C., and Rajewsky, K. (1989). Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways, *Annual Rev Immunol* 7, 537-559.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., and Takada, K. (1999). Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata, *J Virol* 73, 9827-9831.
- Kremmer, E., Kranz, B. D., Hille, A., Klein, K., Eulitz, M., Hoffmann-Fezer, G., Feiden, W., Herrmann, K., Delecluse, H.-J., Delsol, G., *et al.* (1995). Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B), *Virology* 208, 336-342.
- Kroese, F. G., Wubben, A. S., Seijen, H. G., and Nieuwenhuis, P. (1987). Germinal centers develop oligoclonally, *Eur J Immunol* 17, 1069-1072.
- Kroese, F. G. M., Timens, W., and Nieuwenhuis, P. (1990). Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function., *Curr Top Pathol* 84, 103-148.

- Küppers, R., Hansmann, M.-L., and Rajewsky, K. (1997). Micromanipulation and PCR analysis of single cells from tissue sections. In Weir's Handbook of Experimental Immunology, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, D. M. Weir, and C. Blackwell, eds. (Malden, MA, Blackwell Science), pp. 206.1-206.4.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M. L., and Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas, *N Engl J Med* **341**, 1520-1529.
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M. L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development, *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10962-10966.
- Küppers, R., Sonoki, T., Satterwhite, E., Gesk, S., Harder, L., Oscier, D. G., Tucker, P. W., Dyer, M. J., and Siebert, R. (2002). Lack of somatic hypermutation of IG V(H) genes in lymphoid malignancies with t(2;14)(p13;q32) translocation involving the BCL11A gene, *Leukemia* **16**, 937-939.
- Küppers, R., Sousa, A. B., Baur, A. S., Strickler, J. G., Rajewsky, K., and Hansmann, M. L. (2001). Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL, *Mol Med* **7**, 285-292.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L., and Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections, *EMBO J* **12**, 4955-4967.
- Laffaille, J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y., and Tonegawa, S. (1989). Junctional sequences of the T-cll receptor α genes: Implications for α T cell lineages and for a novel intermediate of V(D)J-joining., *Cell* **59**, 859.
- Laherty, C. D., Hu, H. M., Oipari, A. W., Wang, F., and Dixit, V. M. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor κ B., *J Biol Chem* **267**, 24157-24160.
- Lam, K. P., Kühn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death, *Cell* **90**, 1073-1083.
- Lawrence, J. B., Villnave, C. A., and Singer, R. H. (1988). Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line, *Cell* **52**, 51-61.
- Lee, I., Kim, M. K., Choi, E. Y., Mehl, A., Jung, K. C., Gil, M. C., Rowe, M., and Park, S. H. (2001). CD99 expression is positively regulated by Sp1 and is negatively regulated by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through nuclear factor- κ B, *Blood* **97**, 3596-3604.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., and Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1, *Nature* **375**, 685-688.
- Liu, Y. J., and Banchereau, J. (1997). Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells, *Semin Immunol* **9**, 235-240.
- Liu, Y. J., Johnson, G. D., Gordon, J., and MacLennan, I. C. (1992). Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses, *Immunol Today* **13**, 17-21.
- Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y., and MacLennan, I. C. (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens, *Eur J Immunol* **21**, 2951-2962.
- Locker, J., and Nalesnik, M. (1989). Molecular genetic analysis of lymphoid tumors arising after organ transplantation, *Am J Pathol* **135**, 977-987.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology, *Cell* **104**, 487-501.
- Longnecker, R., and Kieff, E. (1990). A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1, *J Virol* **64**, 2319-2326.

- MacLennan, I. C., Liu, Y. J., and Johnson, G. D. (1992). Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses, *Immunol Rev* 126, 143-161.
- Magrath, I. (1990). The pathogenesis of Burkitt's lymphoma, *Adv Cancer Res* 55, 133-270.
- Mann, K. P., Staunton, D., and Thorley-Lawson, D. A. (1985). Epstein-Barr virus-encoded protein found in plasma membranes of transformed cells, *J Virol* 55, 710-720.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H. D., Huhn, D., and Stein, H. (1999). Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell, *J Clin Oncol* 17, 3804-3809.
- Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.-D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., and Stein, H. (2000). Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription, *Blood* 95, 1443-1450.
- Matsuda, F., Shin, E. K., Nagaoka, H., Matsumura, R., Haino, M., Fukita, Y., Taka-ishi, S., Imai, T., Riley, J. H., Anand, R., *et al.* (1993). Structure and physical map of 64 variable segments in the 3' 0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus., *Nature Genet* 3, 88-94.
- Matsumoto, M., Lo, S. F., Carruthers, C. J., Min, J., Mariathasan, S., Huang, G., Plas, D. R., Martin, S. M., Geha, R. S., Nahm, M. H., and Chaplin, D. D. (1996). Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin- α - deficient mice, *Nature* 382, 462-466.
- McBlane, J. F., van Gent, D. C., Ramsden, D. A., Romeo, C., Cuomo, C. A., Gellert, M., and Oettinger, M. A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps, *Cell* 83, 387-395.
- McKean, D., Hüppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., and Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin, *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 3180-3184.
- Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M. C. (2000). Antibody regulation of B cell development, *Nat Immunol* 1, 379-385.
- Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B., and Kieff, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases, *Immunity* 2, 155-166.
- Minarovits, J., Hu, L. F., Imai, S., Harabuchi, Y., Kataura, A., Minarovits-Kormuta, S., Osato, T., and Klein, G. (1994). Clonality, expression and methylation patterns of the Epstein-Barr virus genomes in lethal midline granulomas classified as peripheral angiocentric T cell lymphomas, *J Gen Virol* 75, 77-84.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell, *J Virol* 71, 4882-4891.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family, *Cell* 80, 389-399.
- Mueller, N., Evans, A., Harris, N. L., Comstock, G. W., Jellum, E., Magnus, K., Orentreich, N., Polk, B. F., and Vogelstein, J. (1989). Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis, *N Engl J Med* 320, 689-695.
- Munoz, N., Davidson, R. J., Witthoff, B., Ericsson, J. E., and De-The, G. (1978). Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease, *Int J Cancer* 22, 10-13.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme, *Cell* 102, 553-563.
- Müschen, M., Küppers, R., Spieker, T., Bräuninger, A., Rajewsky, K., and Hansmann, M.-L. (2001). Molecular single-cell analysis of Hodgkin- and Reed-Sternberg cells harboring unmutated immunoglobulin variable region genes., *Lab Invest* 81, 289-295.

- Müschen, M., Rajewsky, K., Bräuninger, A., Baur, A. S., Oudejans, J. J., Roers, A., Hansmann, M.-L., and Küppers, R. (2000). Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma, *J Exp Med* 191, 387-394.
- Nemerow, G. R., Wolfert, R., McNaughton, M. E., and Cooper, N. R. (1985). Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2), *J Virol* 55, 347-351.
- Neri, A., Barriga, F., Inghirami, G., Knowles, D. M., Neequaye, J., Magrath, I. T., and Dalla-Favera, R. (1991). Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphoma, *Blood* 77, 1092-1095.
- Neuberger, M. S., and Milstein, C. (1995). Somatic hypermutation, *Curr Opin Immunol* 7, 248-254.
- Nichols, K. E., Harkin, D. P., Levitz, S., Krainer, M., Kolquist, K. A., Genovese, C., Bernard, A., Ferguson, M., Zuo, L., Snyder, E., *et al.* (1998). Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13765-13770.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D. H., and Young, L. S. (1997). Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells, *J Pathol* 182, 151-159.
- Niedobitek, G., Hansmann, M. L., Herbst, H., Young, L. S., Dienemann, D., Hartmann, C. A., Finn, T., Pitteroff, S., Welt, A., Anagnostopoulos, I., and *et al.* (1991). Epstein-Barr virus and carcinomas: undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus, *J Pathol* 165, 17-24.
- Niedobitek, G., Herbst, H., Young, L. S., Brooks, L., Masucci, J., Crocker, A. B., Rickinson, A. B., and Stein, H. (1992). Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue, *Blood* 79, 2520-2526.
- Niu, H., Ye, B. H., and Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor, *Genes Dev* 12, 1953-1961.
- Notarangelo, L. D., Duse, M., and Ugazio, A. G. (1992). Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM), *Immunodef Rev* 3, 101-121.
- Novobrantseva, T. I., Martin, V. M., Pelanda, R., Müller, W., Rajewsky, K., and Ehlich, A. (1999). Rearrangement and expression of immunoglobulin light chain genes can precede heavy chain expression during normal B cell development in mice, *J Exp Med* 189, 75-88.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination, *Science* 248, 1517-1523.
- Okazaki, I. M., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K., and Honjo, T. (2002). The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts, *Nature* 416, 340-5.
- Onizuka, T., Moriyama, M., Yamochi, T., Kuroda, T., Kazama, A., Kanazawa, N., Sato, K., Kato, T., Ota, H., and Mori, S. (1995). BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts, *Blood* 86, 28-37.
- Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S. J., Rowe, M., and Young, L. S. (1991). Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease, *Lancet* 337, 320-322.
- Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S. J., and Zhou, X. (1993). The association of Epstein-Barr virus (EBV) with T cell lymphoproliferations and Hodgkin's disease: two new developments in the EBV field, *Adv Cancer Res* 62, 179-239.
- Parolini, S., Bottino, C., Falco, M., Augugliaro, R., Giliani, S., Franceschini, R., Ochs, H. D., Wolf, H., Bonnefoy, J. Y., Biassoni, R., *et al.* (2000). X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells, *J Exp Med* 192, 337-346.
- Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R. M., Nemazee, D., and Rajewsky, K. (1997). Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification, *Immunity* 7, 765-775.
- Peters, A., and Storb, U. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation, *Immunity* 4, 57-65.

- Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S., and Neuberger, M. S. (2002). AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification, *Nature* **418**, 99-103.
- Prang, N. S., Hornef, M. W., Jager, M., Wagner, H. J., Wolf, H., and Schwarzmann, F. M. (1997). Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state, *Blood* **89**, 1665-1677.
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C., and Pear, W. S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination, *Immunity* **11**, 299-308.
- Purtilo, D. T., Cassel, C. K., Yang, J. P., and Harper, R. (1975). X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease), *Lancet* **1**, 935-940.
- Rada, C., Gonzales-Fernandez, A., Jarvis, J. M., and Milstein, C. (1994). The 5' boundary of somatic hypermutation in a κ gene is the leader intron., *Eur J Immunol* **24**, 1453-1457.
- Rada, C., Williams, G. T., Nilsen, H., Barnes, D. E., Lindahl, T., and Neuberger, M. S. (2002). Immunoglobulin Isotype Switching Is Inhibited and Somatic Hypermutation Perturbed in UNG-Deficient Mice, *Curr Biol* **12**, 1748-1755.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1, *Immunity* **10**, 547-558.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system, *Nature* **381**, 751-758.
- Ravetch, J. V., Siebenlist, U., Korsmeyer, S., Waldmann, T., and Leder, P. (1981). Structure of the human immunoglobulin μ locus: Characterisation of embryonic and rearranged J and D genes., *Cell* **27**, 583-591.
- Reth, M., Hombach, J., Wienands, J., Campbell, K. S., Chien, N., Justement, L. B., and Cambier, J. C. (1991). The B-cell antigen receptor complex, *Immunol Today* **12**, 196-201.
- Retter, M. W., and Nemazee, D. (1998). Receptor editing occurs frequently during normal B cell development, *J Exp Med* **188**, 1231-1238.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Lagelouse, R., Gennery, A., *et al.* (2000). Activation-induced cytidin deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2), *Cell* **102**, 565-575.
- Reynaud, C. A., Garcia, C., Hein, W. R., and Weill, J. C. (1995). Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process, *Cell* **80**, 115-125.
- Reynolds, D. J., Banks, P. M., and Gulley, M. L. (1995). New characterization of infectious mononucleosis and a phenotypic comparison with Hodgkin's disease, *Am J Pathol* **146**, 379-388.
- Rickinson, A. B., Epstein, M. A., and Crawford, D. H. (1975). Absence of infectious Epstein-Barr virus in blood in acute infectious mononucleosis, *Nature* **258**, 236.
- Rickinson, A. B., and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus. In Fields' Virology, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), pp. 2575-2627.
- Roberts, M. L., and Cooper, N. R. (1998). Activation of a ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation, *Virology* **240**, 93-99.
- Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G., and Salmon, P. (1996). An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages, *Cell* **87**, 483-492.
- Roes, J., Hüppi, K., Rajewsky, K., and Sablitzky, F. (1989). V gene rearrangement is required to fully activate the hypermutation mechanism in B cells., *J Immunol* **142**, 1022-1026.
- Rogerson, B. J. (1994). Mapping the upstream boundary of somatic mutations in rearranged immunoglobulin transgenes and endogenous genes., *Mol Immunol* **31**, 83-98.
- Rogozin, I. B., and Kolchanov, N. A. (1992). Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequence on mutagenesis, *Biochimica Biophysica Acta* **1171**, 11-18.

- Rosdahl, N., Larsen, S. O., and Clemmesen, J. (1974). Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience, *Br Med J* 2, 253-256.
- Rothenfluh, H. S., Taylor, L., Bothwell, A. L. M., Both, G. W., and Steele, E. J. (1993). Somatic hypermutation in 5' flanking regions of heavy chain antibody variable regions., *Eur J Immunol* 23, 2152-2159.
- Rowe, M., Rowe, D. T., Gregory, C. D., Young, L. S., Farrell, P. J., Rupani, H., and Rickinson, A. B. (1987). Differences in B-cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells., *EMBO J* 6, 2743-2751.
- Ruf, I. K., Rhyne, P. W., Yang, C., Cleveland, J. L., and Sample, J. T. (2000). Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of Burkitt lymphoma cells independently of an effect on apoptosis, *J Virol* 74, 10223-10228.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, 3rd edn (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M. G., *et al.* (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM, *Nature* 395, 462-469.
- Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P., and Staudt, L. M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control, *Immunity* 13, 199-212.
- Shapiro, R. S., McClain, K., Frizzera, G., Gajl-Peczalska, K. J., Kersey, J. H., Blazar, B. R., Arthur, D. C., Patton, D. F., Greenberg, J. S., Burke, B., and *et al.* (1988). Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation, *Blood* 71, 1234-1243.
- Sharp, T. V., Schwemmler, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C. G., Hilse, K., and Clemens, M. J. (1993). Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA, *Nucleic Acids Res* 21, 4483-4490.
- Shlomchik, M. J., Aucoin, A. H., Pisetsky, D. S., and Weigert, M. G. (1987). Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9150-9154.
- Siebenkotten, G., and Radbruch, A. (1995). Towards a molecular understanding of immunoglobulin class switching, *Immunologist* 3/4, 141-145.
- Silins, S. L., Sheritt, M. A., Silleri, J. M., Cross, S. M., Elliott, S. L., Bharadwaj, M., Le, T. T., Morrison, L. E., Khanna, R., Moss, D. J., *et al.* (2001). Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load, *Blood* 98, 3739-37344.
- Sixbey, J. W., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A., and Pagano, J. S. (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells, *N Engl J Med* 310, 1225-1230.
- Spieker, T., Kurth, J., Küppers, R., Rajewsky, K., Bräuninger, A., and Hansmann, M. L. (2000). Molecular single-cell analysis of the clonal relationship of small Epstein-Barr virus-infected cells and Epstein-Barr virus-harboring Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin disease, *Blood* 96, 3133-3138.
- Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching, *Curr Opin Immunol* 8, 199-205.
- Steele, E. J. (1991). *Somatic hypermutation in V regions.*, Boca Raton: CRC Press.
- Stein, H., Gerdes, J., and Mason, D. (1982). The normal and malignant germinal center, *Clin Haematol* 11.
- Strobl, L. J., Hofelmayr, H., Marschall, G., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., and Zimmer-Strobl, U. (2000). Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2, *J Virol* 74, 1727-1735.
- Sugawara, Y., Mizugaki, Y., Uchida, T., Torii, T., Imai, S., Makuuchi, M., and Takada, K. (1999). Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression, *Virology* 256, 196-202.

- Szeles, A., Falk, K. I., Imreh, S., and Klein, G. (1999). Visualization of alternative Epstein-Barr virus expression programs by fluorescent in situ hybridization at the cell level, *J Virol* 73, 5064-5069.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis, *Cell* 50, 203-213.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells, *J Exp Med* 177, 1009-1020.
- Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., and Rickinson, A. B. (1994). Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state, *J Virol* 68, 7374-7385.
- Tokunaga, M., Uemura, Y., Tokudome, T., and Sato, E. (1993). Epstein-Barr virus-infected T cells in infectious mononucleosis, *Acta Pathol Jpn* 43, 146-147.
- Tomlinson, I. M., and Cook, G. P. (1997). Human immunoglobulin variable region genes. In *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, D. M. Weir, and C. Blackwell, eds. (Malden, MA, Blackwell Science).
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity, *Nature* 302, 575-81.
- Tosato, G., Steinberg, A. D., Yarchoan, R., Heilman, C. A., Pike, S. E., De Seau, V., and Blaese, R. M. (1984). Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus-infected B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis, *J Clin Invest* 73, 1789-1795.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr Virus LMP1 in B lymphocyte response, *Science* 286, 300-303.
- Vasicek, T. J., and Leder, P. (1990). Structure and expression of the human immunoglobulin κ genes, *J Exp Med* 172, 609-620.
- Vockerodt, M., Soares, M., Kanzler, H., Küppers, R., Kube, D., Hansmann, M. L., Diehl, V., and Tesch, H. (1998). Detection of clonal Hodgkin and Reed-Sternberg cells with identical somatically mutated and rearranged VH genes in different biopsies in relapsed Hodgkin's disease, *Blood* 92, 2899-2907.
- Wang, S., Rowe, M., and Lundgren, E. (1996). Expression of Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homolog Mcl-1 levels in B-cell lines., *Cancer Res* 56, 4610-4613.
- Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B. J., Cado, D., and Robey, E. (1997). Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision, *Cell* 88, 833-843.
- Weiss, L. M., Movahed, L. A., Warnke, R. A., and Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease, *N Engl J Med* 320, 502-506.
- Weiss, U., and Rajewsky, K. (1990). The repertoire of somatic antibody mutants accumulating in the memory compartment after primary immunization is restricted through affinity maturation and mirrors that expressed in the secondary response., *J Exp Med* 172, 1681-1689.
- Weiss, U., Zobelein, R., and Rajewsky, K. (1992). Accumulation of somatic mutants in the B cell compartment after primary immunization with a T cell-dependent antigen, *Eur J Immunol* 22, 511-517.
- Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M. C., Le Deist, F. F., de Saint Basile, G. G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C. A., and Weill, J. C. (2001). CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1166-1170.
- William, J., Euler, C., Christensen, S., and Shlomchik, M. J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers, *Science* 297, 2066-2070.
- Williams, S. C., Fripiat, J.-P., Tomlinson, I. M., Ignatovich, O., Lefranc, M.-P., and Winter, G. (1996). Sequence and evolution of the human germline V λ repertoire, *J Mol Biol* 264, 220-232.

- Wilson, P. C., de Bouteiller, O., Liu, Y. J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J. D., and Pascual, V. (1998). Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes, *J Exp Med* 187, 59-70.
- Xu, J., Foy, T. M., Laman, J. D., Elliott, E. A., Dunn, J. J., Waldschmidt, T. J., Elsemore, J., Noelle, R. J., and Flavell, R. A. (1994). Mice deficient for the CD40 ligand, *Immunity* 1, 423-431.
- Yoshikawa, K., Okazaki, I. M., Eto, T., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., and Honjo, T. (2002). AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts, *Science* 296, 2033-2036.
- Zan, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M. F., Diaz, M., and Casali, P. (2001). The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation, *Immunity* 14, 643-53.
- Zeng, X., Winter, D. B., Kasmer, C., Kraemer, K. H., Lehmann, A. R., and Gearhart, P. J. (2001). DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes., *Nat Immunol* 2, 537-541.
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., and Arnheim, N. (1992). Whole genome amplification from a single cell: Implication for genetic analysis, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5847-5851.
- Zimber-Strobl, U., Kempkes, B., Marschall, G., Zeidler, R., Van Kooten, C., Banchereau, J., Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival, *Embo J* 15, 7070-7078.
- Zimber-Strobl, U., and Strobl, L. J. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes, *Semin Cancer Biol* 11, 423-434.
- Zimber-Strobl, U., Strobl, L. J., Meitinger, C., Hinrichs, R., Sakai, T., Furukawa, T., Honjo, T., and Bornkamm, G. W. (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of *Drosophila* Suppressor of Hairless, *Embo J* 13, 4973-4982.
- zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx, *Nature* 228, 1056-1058.

8 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1997 bis März 2002 unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Rajewsky am Institut für Genetik der Universität zu Köln angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Rajewsky für die intensive Betreuung und die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Bei PD. Dr. Ralf Küppers möchte ich mich ganz besonders für die hervorragende Betreuung und die spannenden und fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann danke ich für die anregenden Diskussionen und die morphologische Identifizierung der HRS-ähnlichen Zellen.

Bei Herrn PD. Dr. Jochen Wustrow und Herr Dr. John G. Strickler bedanke ich mich für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

Herrn Prof. Dr. Volker Diehl danke ich für die Bereitstellung der Laborräume der Medizinischen Klinik I für Innere Medizin.

Für das sehr gute Arbeitsklima, die tatkräftige Unterstützung und die vielen hilfreichen Diskussionen danke ich Ines Schwering, Michaela Fahrig, Julia Jesdinsky, Tilmann Spieker, Berit Jungnickel, Mirela Stecki, Verena Diestler, Ursula Zimmer-Strobl, Tina Goossens, Holger Kanzler, Ulf Klein, Roland Schmitz, Holger Babbe, Andreas Bräuninger, Martina Vockerodt und Dörte Bechtel.

Vielen Dank an meine Mutter, die mich all die Jahre auf vielfältige Weise unterstützt hat. Meinem Freund, Martin Gildenagel, meiner Familie und meinen Freunden verdanke ich die ständige, vielseitige Ermutigung und die ebenso notwendige, nicht wissenschaftliche Unterstützung.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabelle, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Prof. Dr. Klaus Rajewsky betreut.

Köln, Dezember 2002

Teilpublikationen:

Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G. J., Hansmann, L. M., Rajewsky, K., und Küppers, R. (2000). EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency, *Immunity* 13, 485-495.

Kurth, J., Hansmann, L. M., Rajewsky, K., und Küppers, R. (2003). Epstein-Barr Virus-Infected B Cells in Germinal Centers of Infectious Mononucleosis Patients Show an unusual Viral Gene Expression Pattern and do not Participate in the Germinal Center Reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4730-4735.

Lebenslauf

Köln, im Dezember 2002

Persönliche Daten

Julia B. Kurth
geb. 13.09.1971 in Porz am Rhein

Schulbildung

1978-1982: katholische Grundschule in Bergisch Gladbach
1982-1991: Nicolaus-Cusanus-Gymnasium in Bergisch Gladbach
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

1991-1993: Biologiestudium an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
Oktober 1993: Vordiplom im Fach Biologie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
1993-1997: Fortsetzung des Biologiestudiums an der Universität zu Köln
August 1997: Diplomabschluß am Institut für Genetik der Universität zu Köln (AG Prof. Dr. K. Rajewsky)

September 1997: Beginn des Promotionsstudiums an der Universität zu Köln (AG Prof. Dr. K. Rajewsky)